

【基盤研究(S)】
生物系(生物学)



研究課題名 気孔孔辺細胞における光情報のイオン輸送への変換機構

九州大学・大学院理学研究院・教授 しまざき けんいちろう
島崎 研一郎

研究分野：植物生理学

キーワード：気孔、光情報伝達、環境応答、フォトロピン、細胞膜 H⁺-ATPase

【研究の背景・目的】

気孔が植物の遭遇する多くの環境要因(青色光、赤色光、複数の植物ホルモン、CO₂、Ca²⁺、O₃など)に応答できるのは気孔を構成する孔辺細胞の働きによってであり、孔辺細胞は情報の受容と応答をもっとも発達させた細胞の一つです。光はとりわけ重要な環境情報で光受容体としてフォトトロピンが標的酵素として細胞膜 H⁺-ATPase が機能し、気孔開口を引き起こすことが分かっています。しかし、フォトトロピンからの光シグナル変換機構、細胞膜 H⁺-ATPase への情報伝達など多くの未解明点があります。一方、フォトトロピンは光屈性、葉緑体運動、葉の展開、などを司る多芸な光受容酵素であり、細胞膜 H⁺-ATPase は二次輸送体と共役して多種類のイオンや有機物の輸送を駆動する重要な酵素です。本研究は、孔辺細胞をモデル材料として青色光情報の受容・変換・伝達と細胞膜 H⁺-ATPase の活性制御機構を研究し、2つの重要な酵素の働きを解明するとともに、植物細胞における光情報伝達の典型例を確立する事を目的としています。

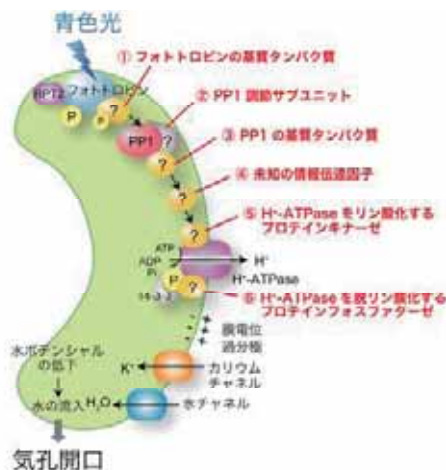
【研究の方法】

生化学的、分子生物学的、生理学的方法等を用いて研究を行います。電気泳動によって情報伝達に関与するタンパク質を分離、特定し、質量分析等によってその遺伝子を同定します。それに基づいて分子遺伝学的方法によって変異体を作成(あるいはタグライン等の取得)して当該タンパク質の機能を解析します。目的とする変異体を使用できない場合、孔辺細胞に当該の遺伝子を物理的に導入することによって一過的に当該タンパク質を発現させ、その機能を調べる方法も用います。変異原を使用して気孔応答に異常をきたした植物体の原因遺伝子の特定によって、未知の情報伝達体の解明も行います。

【期待される成果と意義】

気孔の光による開口には反応を開始させる光受容体、開口の駆動力を生じる細胞膜 H⁺-ATPase、さらに、この間をつなぐタイプ1プロテインフォスファターゼが機能しています。植物にとって適切な環境応答がその生存に必須ですが、応答に重要な光情報伝達系の理解には構成成分の同定が不可

欠です。植物の光情報伝達系に関して全貌が解明された例はなく、孔辺細胞を材料にして光情報伝達の構成成分を解明することは大きな意義があります。下図には今まで明らかにされた気孔の青色光情報伝達成分と今後明らかにすべき成分(赤字)を示しています。この成分を同定していくことによって、植物細胞の環境応答の仕組みを示す事ができると思います。



【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Takemiya, A., Kinoshita, T., Shimazaki, K. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103: 13549-13554.
Shimazaki, K., Doi, M., Assmann, SM., Kinoshita, T. (2007) Annu. Rev. Plant Biol. 58: 219-247
Inoue, S., Kinoshita, T., Matsumoto, M., Nakayama, KI., Doi, M., Shimazaki, K. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105: 5626-5631

【研究期間と研究経費】

平成 21 年度-25 年度
158,400 千円
ホームページ等

<http://cellbio.biology.kyushu-u.ac.jp/shimazaki/>

【基盤研究(S)】 生物系(生物学)



研究課題名 新種の出現：種分化と大進化の分子機構

東京工業大学 大学院生命理工学研究科 教授 おかだ のりひろ
岡田 典弘

研究分野： 生物学

キーワード： 進化

【研究の背景・目的】

現在の科学的見地から「新種の出現」の問題は二つのカテゴリーに分ける事が可能である。第一のカテゴリーはある一つの種が自然選択を受けアリの連続的な頻度変化の過程で種分化を起こすプロセスを明らかにするという事である。これはある意味では連続的な変化の過程で起る現象であり、ダーウィンが百年以上前に形態の連続的な変化の観察により「種の起原」で提唱したメカニズムの分子機構を明らかにしようとするものである。第二のカテゴリーは、形態的進化の立場からは、「大進化」と言われているものの分子機構を明らかにしようとするものである。これは新しい分類群の出現を分子レベルで説明しようとするもので、例えば、爬虫類の中から哺乳動物という分類群がどのようにして出現したのか？というような問題である。本研究の目的はこれら2つのカテゴリーの研究により「新種の出現」の分子機構を明らかにする事である。

【研究の方法】

カテゴリー(I) 種分化

本研究は次の4つの段階の研究を順次進行して完成させる予定である。1) シクリッドを用い、光受容体が生息する光環境に適応していることを明らかにする。2) 婚姻色を形成する遺伝子の単離を行う。3) 光環境に適応した光受容体が感度よく受容できる色に婚姻色が進化したことを明らかにし、配偶者認識が確立していることを示す。4) 婚姻色を形成する遺伝子の機能解析を行い、その遺伝子の進化と視覚の進化から引き起こされる種分化の機構を明らかにする。

カテゴリー(II) 大進化

大進化に繋がる形態獲得メカニズムを解明するため、次の3段階の研究を推進する。1) 哺乳類特異的に保存されたSINE由来エンハンサーの網羅的探索、2) エンハンサーの対象遺伝子の発現様式と発現カスケードの解明、3) 遺伝子の細胞生物学的機

能解析、および哺乳類特異的な形態形成の発生学的研究。

【期待される成果と意義】

本研究では1つの種が新しい2つの種に分化する過程、「種分化」と、種が新しい形態を獲得する過程「大進化」を明らかにしようとしている。種分化では感覚器の適応が引き起こす生殖的隔離の分子機構を明らかにできることを期待している。大進化では、エンハンサー配列の獲得による新しい形態の獲得の機構を明らかにできることを期待している。これらの成果を得ることができれば、それは種分化と大進化の分子機構というだけでなく、生物多様性の獲得機構であり、生物進化そのものの機構でもある。そのため本研究は生物の多様性獲得の研究を分子レベルで行うブレイクスルーとなり、日本発の新しい研究分野として発展し、世界の先駆けとなることが期待される。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

1. Seehausen O, Terai Y, Magalhaes IS, Carleton KL, Mrosso HD, Miyagi R, van der Sluijs I, Schneider MV, Maan ME, Tachida H, Imai H, Okada N. Speciation through sensory drive in cichlid fish. **Nature (Article)**. 455:620-6 (2008)
2. Sasaki T, Nishihara H, Hirakawa M, Fujimura K, Tanaka M, Kokubo N, Kimura-Yoshida C, Matsuo I, Sumiyama K, Saitou N, Shimogori T, Okada N. Possible involvement of SINEs in mammalian-specific brain formation. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 105:4220-5 (2008)

【研究期間と研究経費】

平成21年度－25年度

113,800千円

ホームページ等

<http://www.evolution.bio.titech.ac.jp/index0.html>

【基盤研究(S)】 生物系(生物学)



研究課題名 X線結晶構造解析による細胞内及び細胞間での物質輸送の研究

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・特任教授

つきはら とみたけ
月原 富武

研究分野：構造生物化学

キーワード：X線結晶解析

【研究の背景・目的】

高等な生物では、特定の分子を働かすべき場所に輸送する仕組みがあり、そのことによって高度に制御された生命の営みが可能になっている。こうした輸送に関わる生体超分子の立体構造を決定して、その働きを明らかにするのが本研究の目的である。特定の化学物質を運ぶ担体がどのように化学物質を認識し、どのような仕組みで目的の場所に移動するかを3つのケースで解き明かしたい。

細胞膜を介した物質の輸送に関わる膜蛋白質は多くある。そのうち、多細胞生物の細胞間コミュニケーションなどで重要な役割を果たしているのがギャップ結合チャネルである。本研究では、ギャップ結合チャネルのX線結晶構造解析を行う。

細胞質から細胞外排出及び核内への輸送ではボルト、核外への輸送ではイクスポーティンを研究対象に取りあげる。

我々は、ここ4～8年これらの生体超分子の調製、結晶化に集中的に取り組んで、何れも結晶化に成功して構造決定も進展してきた。

【研究の方法】

ギャップ結合チャネルでは、開孔型、閉孔型コネキシン26の構造を共に3.0Åを超える分解能で決定し、チャネルの開閉機構を解明する。またホモロジーモデリングによって細胞間接着が可能な異なったコネクソンの組み合わせを提案する。

ボルトは3.0Åを超える分解能の構造解析を行い、全構造を決定する。約100残基のC末領域ペプチドを発見、結晶化して構造決定を行う。これらの構造に基づいて構造構築機構および運ぶべき分子の取込み機構を解明する。

ボルトのX線結晶構造解析では、ウイルス以外では最大の分子の構造解析である。極めて薄い殻構造で巨大な中空を持つ粒子の構造ができる仕組みは全く謎である。構造構築の仕組みを解き明かすのがひとつの特徴である。

イクスポーティンはExportin・RanGTP・pre-microRNA 3者複合体の構造決定を3.0Å分解能で行う。

【期待される成果と意義】

蛋白質分子による輸送の神秘は、蛋白質が目的の分子を捕獲する仕組み、それが移動する仕組み、あるいは目的の化合物が移動する経路を通過

させる仕組みを調べることによって解き明かすことができる。

コネキシンのX線結晶構造解析では、細胞間での直接的な物質輸送の仕組みを明らかにするところに研究の特徴がある。

Exportin・RanGTP・Pre-microRNA 3者複合体のX線結晶構造解析では、イクスポーティンによるPre-microRNAの核外への輸送機構を解明するものである。細胞質においてRNA干渉を行うRNAを特異的に認識する仕組みの解明が最大の特徴である。

何れの研究においても、蛋白質複合体を精製、結晶化する過程がある。その困難さのために、まだ他の研究グループからは結晶化の成功例は出されていない。いずれの構造も今後の研究の要石となる。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

・ S. Maeda, S. Nakagawa, M. Suga, E. Yamashita, A. Oshima, Y. Fujiyoshi and T. Tsukihara, Structure of the connexin-26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Nature*, **458**, 597-602 (2009).

・ H. Tanaka, K. Kato, E. Yamashita, T. Sumizawa, Y. Zhou, M. Yao, K. Iwasaki, M. Yoshimura and T. Tsukihara, The structure of rat liver vault at 3.5 angstrom resolution. *Science*, **323**, 384-388 (2009).

【研究期間と研究経費】

平成21年度～25年度

180,900千円

ホームページ等

http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/GCOE/japanese/pico_intro/tsukihara/index.html


研究課題名 寿命と発生を制御するシグナル伝達ネットワーク

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

 にしだ えいすけ
 西田 栄介

研究分野：生物学・生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞情報伝達機構

【研究の背景・目的】

細胞内シグナル伝達ネットワークは、様々な生命現象を制御する重要な役割を担っている。ヒトやモデル生物のゲノムプロジェクトが完了した現在、個々の遺伝子の機能や遺伝子間の機能的な関連を解析することが重要な課題となっている。近年盛んに行われている大規模解析により遺伝子に関する膨大なデータが蓄積されてきてはいるが、シグナル伝達という観点から見ると、その全貌解明にはまだまだ至っていないのが現状である。したがって、これら膨大なゲノムデータを有効に活用しつつ、個々のシグナル伝達経路がどのように関連しあるいは協調しながら高次生命現象を制御しているかを明らかにすることは、生命現象の根本原理に迫るうえで極めて重要である。本研究では、寿命や発生といった多細胞生物の時間軸に沿った生命現象に注目し、モデル生物を用いた多方面からのアプローチにより、新たな細胞内シグナル伝達分子や経路の同定、および種々のシグナル伝達経路間におけるネットワークを明らかにすることを目的とする。

【研究の方法】

第一に、寿命および発生を制御するシグナル伝達経路について、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析、バイオインフォマティクスによるプロモーター解析、変異体や RNAi 法による体系的スクリーニング、MO (モルフォリノ) を用いたノックダウン実験等を駆使することによって、新規シグナル伝達分子や新規シグナル伝達経路の同定を行うことを目的とする。第二に、同定したシグナル伝達経路や既知のシグナル伝達経路間における相互作用を検討し、寿命や発生といった高次生命現象という観点からシグナル伝達経路のネットワークを明らかにすることを目指す。

【期待される成果と意義】

発生過程や寿命制御における新規シグナル伝達経路およびそれらが構成するネットワークを解明することで、生体内で働く情報伝達機構の根本原理を明らかとし、シグナル伝達学、寿命生物学、発生生物学の分野に革新的な視点をもたらすことが期待される。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Honjoh, S., Yamamoto, T., Uno, M., and Nishida, E. Signalling through RHEB-1 mediates intermittent fasting-induced longevity in *C. elegans*. *Nature* 457, 726-730 (2009).
- Hanafusa, H., Matsumoto, K., and Nishida, E. Regulation of ERK activity duration by Sprouty contributes to dorsoventral patterning. *Nature Cell Biol.* 11, 106-109 (2009).

【研究期間と研究経費】

平成21年度－25年度

164,000千円

ホームページ等

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/signal/>

【基盤研究(S)】

生物系(生物学)



研究課題名 細胞接着とシグナル伝達による細胞の形態形成機構

神戸大学・大学院医学研究科・教授

たかい よしみ
高井 義美

研究分野：生物学

キーワード：細胞情報伝達機構

【研究の背景・目的】

個体中のそれぞれの細胞は様々な細胞機能を発揮するためにそれぞれ特異的な細胞形態をとる。また、個々の細胞形態は不変なものではなく、外的環境や様々な刺激などに反応してその形態を柔軟に変化させる。細胞形態の変化は個体が環境に適応して生存していくために必須であり、細胞形態の不可逆的破壊は臓器機能の低下、さらには、生命の危機につながり得る。したがって、細胞の形態形成機構を解析することは生物学的にも医学的にも極めて重要であるが、その解析は十分には進んでいない。本研究では、申請者らが見出した新規接着分子ネクチン-アフアディン系やこれらの分子が制御するシグナル伝達系に着目して、各種細胞の形態形成機構について詳細に検討する。

【研究の方法】

上述の研究計画の達成に向けて、以下の3点について研究を実施する。

(1) 上皮細胞におけるアドヘレンスジャンクション(AJ)とタイトジャンクション(TJ)の位置決定機構と細胞丈の決定機構

上皮細胞では細胞間接着形成が完成すると、細胞間接着部位で側基底側領域と頭頂側領域が分離し、TJがAJの頭頂側に形成されるがこの分子機構は不明である。この問題をAJとTJ構造を持たない線維芽細胞を用いた再構築実験系で解析する。申請者らはすでに、ネクチンとJAMの2種類の接着分子が、線維芽細胞でのAJ構造とTJ構造の再構築に必要不可欠であることを見出している。しかし、再構築されたAJ構造とTJ構造は上皮細胞に見られるような完全なものではなく、両者の位置関係が逆転していた。これらの点を完全なものにするためにさらに必要な因子を探索する。

(2) 上皮-間葉転換(EMT)と間葉-上皮転換(MET)における形態変化の分子機構

EMT初期過程では、上皮細胞のコロニー端で先端導端が形成され、その部位の細胞が遊走し始める。この遊走開始時にみられる先端導端形成の機構に低分子量Gタンパク質などのシグナル分子やネクチン-アフアディン系がどのように関与しているか検討する。また、ネクチンと構造上類似するネクチン様分子がEMTに関わる分子機構についても解析する。逆に、METに関しては、上述したL線維芽細胞の形態から上皮細胞の形態を再構築する系を応用して検討する。

(3) 神経細胞におけるシナプスの形成・リモデリング機構と軸索の選択的形態形成機構

軸索が別の神経細胞の樹状突起と接着してシナプスを形成する際、Puncta adherentia junction (PAJ)部位には、ネクチン-アフアディン系が集積する。また、PAJの内側に存在するアクティブゾーンとシナプス後肥厚には、それぞれCASTやS-SCAMなどが存在することを申請者らが見出し、これらの分子がシナプス形成において重要な役割を果たしていることも明らかにしている。本研究では、これらの研究成果をさらに発展させて、神経細胞の形態形成機構を解析する。

【期待される成果と意義】

これまでの細胞の“形”に関する先行研究に加えて、本研究において、新規接着分子ネクチンおよびその関連分子に着目して、シグナル分子、細胞間接着および細胞-基質間接着の相互作用が細胞形態に及ぼす作用を統合的に検討することにより、種々の細胞の形態形成機構の重要性とその分子機構を解明できると考える。その成果は、細胞の形態形成機構に関する研究分野の新展開となるだけでなく、高等生物における生命現象全般の分子機構解明に向けた端緒にもなり得る。以上の点から、本研究は生物学および医学研究の発展において大きく貢献するものと考えられる。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Takai, Y., Miyoshi, J., Ikeda W., and Ogita H. Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9巻, 603-615, 2008年
- Takai, Y., Ikeda, W., Ogita, H., and Rikitake, Y. The Immunoglobulin-like cell adhesion molecule nectin and its associated protein afadin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 24巻, 309-342, 2008年

【研究期間と研究経費】

平成21年度-25年度

160,000千円

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/mcb/index.html>



研究課題名 極低温電子顕微鏡による細菌べん毛モーターと蛋白質輸送装置の像構造解析

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授 なんば けいいち
難波 啓一

研究分野：生物物理学

キーワード：超分子、機能構像解析、電子顕微鏡像解析、X線解析、細菌べん毛

【研究の背景・目的】

細菌べん毛は、直径約 40 nm の高速回転モーター、太さ約 20 nm で長さ 10 数 mm のらせん繊維型スクリュープロペラ、両者を繋ぐ長さ 55 nm のユニバーサルジョイントなどで構成される生体超分子ナノマシンである。この研究課題の目的は、回転モーターでありべん毛蛋白質輸送装置でもあるべん毛基部体の動作機構の解明のため、未だにその多くが不明な基部体構成蛋白質間相互作用の形態を明らかにすることである。基部体構成蛋白質の多くは、基部体の中核部に弱く結合あるいは結合解離を繰り返してさまざまな機能を発現するが、基部体の単離精製によって解離するため、その相互作用の部位や形態が不明で、動作機構の解明を妨げている。本研究課題の目的は、このように容易に単離精製できない機能状態のべん毛基部体構造をさまざまな工夫により安定化し、極低温電子顕微鏡像の単粒子像解析法によりその立体構造を高分解能で解析し、各構成蛋白質のX線結晶構造と組合せて原子モデルを構築し、各蛋白質分子の相互作用を解析することにより、トルク発生、蛋白質輸送、自己構築制御などのしくみの解明することである。

【研究の方法】

細菌べん毛基部体の回転モーターとしてのトルク発生や、べん毛構築のための蛋白質輸送の機能発現に関わる構成蛋白質は、基部体に弱く結合あるいは結合解離を繰り返すため、通常の方法では単離精製できず、構像解析や機能解析ができない。そこでまず、基部体の安定構造を形成する中心部分を細菌から単離精製し、別に他の基部体構成蛋白質やその安定結合変異体を大量発現系から単離精製し、それらを混合して高濃度で混在させることにより、各蛋白質やその複合体が様々な組み合わせで基部体に結合した超分子構造体の再構成を試みる。そして、極低温電子顕微鏡による単粒子像解析法を用いて立体構造解析を行う。その結果として得られる3次元密度マップに、基部体構成蛋白質やその結合蛋白質のX線結晶構造を組み合せ、基部体と各蛋白質分子の相互作用形態を詳細に解析することにより、トルク発生、蛋白質輸送、自己構築制御のしくみの解明を目指す。

【期待される成果と意義】

これまで生体超分子の構造解析では、安定に単離精製できて、しかも均一な構造を持つものだけを対象にしてこざるを得なかったため、必ずしも機能状態の構造を見ている訳ではなかった。本研究のアプローチは、我々を含む世界中の多くの研究者による技術開発によって最近ますますパワフルになった、低温電子顕微鏡による単粒子像解析法を活用することにより、少々不均一な部分構造を持つ超分子でも、試料調整法と電子顕微鏡像解析法の工夫により、その立体像を可視化しようとするところに大きな特徴がある。極低温電子顕微鏡の優れた解像度はこの目的の達成のために不可欠である。得られた基部体の立体構造からは、トルク発生や蛋白質輸送にしくみに重要な手がかりが得られ、その極めて高いエネルギー変換効率など、物理学的にも興味深い生体超分子ナノマシンの動作機構に深く切り込むことが可能になると期待される。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Minamino, T., Imada, K. & Namba, K. (2008)
Mechanisms of type III protein export for bacterial flagellar assembly. *Mol. BioSyst.* **4**, 1105-1115.
- Minamino, T., Imada, K. & Namba, K. (2008)
Molecular motors of the bacterial flagella. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 693-701.
- Kojima, S., Furukawa, Y., Matsunami, H., Minamino, T. & Namba, K. (2008)
Characterization of the Periplasmic Domain of MotB and Implications for Its Role in the Stator Assembly of the Bacterial Flagellar Motor. *J. Bacteriol.* **190**, 3314-3322.
- González-Pedrajo, B., Minamino, T., Kihara, M. & Namba, K. (2006)
Interactions between C ring proteins and export apparatus components: a possible promotion mechanism for facilitating type III protein export. *Mol. Microbiol.* **60**, 984-998.

【研究期間と研究経費】

平成21年度－25年度
157,600千円
ホームページ等
<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jp/labo/02/>

【基盤研究(S)】

生物系(生物学)



研究課題名 分裂酵母における減数分裂の制御機構

東京大学・大学院理学系研究科・教授

やまもと まさゆき
山本 正幸

研究分野：生物学

キーワード：細胞周期

【研究の背景・目的】

多様で複雑な生命世界を生み出す原動力となった有性生殖の分子機構を知ることは、生命の歴史を知るうえでも、生殖細胞の形成不全や染色体分配異常などの疾病に対処するためにも重要である。有性生殖の過程の中で、減数分裂は、配偶子（卵子や精子）を作るために染色体数を半減させ、また染色体間に高頻度の組換えを誘発して子孫に伝える遺伝情報の交換をもたらす大事なステップである。本研究は、有性生殖を行う最も単純な生物で、研究代表者らが減数分裂研究の最先端の材料にまでその地位を高めてきた分裂酵母を対象として、減数分裂制御の基本メカニズムを明らかにしようとするものである。とりわけ、これまでの研究で減数分裂の新たな制御機構として立ち現れてきた、減数分裂のための mRNA を体細胞周期において特異的に分解する「選択的除去」の分子機構と、栄養源を識別して細胞周期を減数分裂型へと切り替える初期段階の分子機構の解明を目指す。

【研究の方法】

1. 減数分裂に特異的に機能する一群の遺伝子の mRNA は DSR と呼ぶ領域を含んでおり、栄養増殖時には Mmilp というタンパク質が DSR に結合して mRNA を選択的に除去している。この選択的除去の分子メカニズムを明らかにする。

(1) DSR 配列を詳しく比較検討し、機能領域の限定を進めて DSR の基本的要素を明らかにする。

(2) 最終的に mRNA を分解するのが exosome であること、また壊される mRNA はポリ A 付加を受ける必要があることを予備的に解明している。ポリ A 付加が Mmilp および exosome とどのように関連して mRNA の分解を導くかを追究する。

2. TOR は外界情報を細胞の生理状態に繋げるキナーゼである。分裂酵母の 2 種の TOR 複合体 TORC1 と TORC2 は有性生殖に対して抑制と促進の逆方向に働く。これらの制御経路を解明し、栄養源シグナルとの関わりを明らかにする。

(1) TORC1 欠損株と同様に栄養源存在下で有性生殖を開始する突然変異株の解析を進め、原因遺伝子の栄養源識別機構における役割を追究する。

(2) 動物細胞では TORC2 の下流にあり TORC1 を制御するとされる RHEB の分裂酵母ホモログ Rbh1p につき、TOR 経路との関係を究明する。

【期待される成果と意義】

分裂酵母では減数分裂マスター制御因子 Mei2p が活性化すると細胞を強制的に減数分裂へと誘導する。このように減数分裂制御に大きな影響を及ぼす因子は他に類例を見ず、その機能の本質の解明が減数分裂の理解に格段に寄与することは疑う余地がない。我々の研究で、前述した、減数分裂特異的な mRNA が受ける「選択的除去」を抑制するのが Mei2p の果たす大きな役割の一つであると近年明らかになった。本研究では、この選択的除去機構の詳細を明らかにすると同時に、Mei2p のもつ未知の分子機能をも解明しようとしており、その成果は減数分裂の制御機構に新たな概念を付与するであろう。また、TOR 経路と減数分裂と関わりを解明することにより、減数分裂の制御に加えて、TOR 経路の働きや、細胞が栄養源を認識する仕組みといった、細胞生物学の基本的な問いに解答を与えられる可能性が高い。本研究に期待される最も重要な成果は、減数分裂を分子レベルで解明するという純学術的なものであるが、その成果は将来において、減数分裂を遺伝子レベルで人為的に操作する育種技法の開発や、生殖細胞の機能不全による不妊の治療のための重要な知的基盤を提供することも十分に期待できる。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Y. Harigaya, (他 8 名) and M. Yamamoto: Selective elimination of messenger RNA prevents an incidence of untimely meiosis. **Nature** 442, 45-50 (2006).
- T. Matsuo, Y. Otsubo, J. Urano, F. Tamanoi and M. Yamamoto: Loss of the TOR kinase Tor2 mimics nitrogen starvation and activates the sexual development pathway in fission yeast. **Mol. Cell. Biol.** 27, 3154-3164 (2007).

【研究期間と研究経費】

平成 21 年度 - 25 年度

159,800 千円

ホームページ等

<http://www.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/yamamoto-lab/index.html>



研究課題名 生殖細胞の性分化と精子幹細胞の維持を支える分子機構

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授・ **さが ゆみこ**
相賀 裕美子

研究分野：発生生物学

キーワード：生殖細胞、精巢、Nanos, RNA, 減数分裂、幹細胞

【研究の背景・目的】

マウス、ヒトなどの哺乳類において生殖細胞は発生の初期から体細胞系列から分離し、独自の維持システムを確立する。胎生期では、性分化過程をへて、精子・卵子への決定をうける。生殖細胞は唯一、次世代に受け継がれる細胞であり、その性分化決定機構とその維持機構の理解は個体の維持のみならず、種の維持に必須な基本概念をもたらす。我々は、これまでに種をこえて生殖細胞のみに発現し機能する RNA 結合蛋白質 Nanos2 及び Nanos3 に関する解析を行ってきた。近年この中でも特に Nanos2 蛋白質が生殖細胞の雄性分化及び精子幹細胞システムの構築と維持に重要な鍵分子であることを突き止めた。生殖細胞はその独自性の維持機構や、減数分裂の制御機構のみならず、哺乳類に特徴的なインプリンティング確立などエピジェネティックな側面からも注目されている。このような、生殖細胞特異的なシステムを維持する機構の解明は、種を越えて維持されてきた生殖細胞の形成機構に加えて細胞生物学、幹細胞システムなどの理解につながる重要な情報を寄与する。マウスをモデルとして、胎生期における雄性生殖細胞の分化機構、さらに生後の周期的精子形成システムの理解を目指した研究を行う。

【研究の方法】

生体内における生殖細胞の性分化と精子幹細胞の維持機構の解明を目指して以下の4つの計画を平行して走らせる。

計画1) 生殖細胞の性分化制御機構 (Nanos2 の機能解析を柱として)

生殖細胞が生殖巣に入ると、生殖細胞は性分化過程に入る。この過程で雄特異的に発現する Nanos2 が雌のカスケードを抑制し雄の性分化を誘導する。Nanos2 の上流・及び下流の遺伝子群を同定し、主に個体レベルの機能解析を通して生殖細胞性分化機構の分子機構を明らかにする。

計画2) 生後の精子幹細胞システムの維持機構

Nanos2 は、生後の精巣内で未分化な精原細胞に発現しており、精子幹細胞の維持に必要な(未発表)。Nanos2 の発現制御系(遺伝子欠損と強制発現)を利用して、生殖幹細胞の維持と分化の制御機構の解明を目指す。

計画3) 精子形成の周期性の基盤となるセルトリ細胞の周期性の分子基盤

生後の精子形成は規則正しい時間的空間的制御下で進行するが、それを可能にしているのが精子幹細胞および各分化段階のすべての雄性生殖細胞と相互作用するセルトリ細胞が作る微細環境であると考えられる。我々はセルトリ細胞の機能解析を通して精子形成の周期性を作り出す分子機構を解析する。

研究計画4) RNA 結合蛋白質としての Nanos 蛋白質の作用機序の解明

Nanos は直接標的 RNA と結合するのではなく、パートナーである他の RNA 結合蛋白質と共同して標的 RNA の翻訳を抑制すると考えられている。そこで胎生期および生後において Nanos2 と相互作用する蛋白質及び結合 RNA を同定し、Nanos2 の作用機構を解明する。

【期待される成果と意義】

我々は個体レベルでの解析をもとに正常発生における生殖細胞分化の分子機構を解明する。すでに細胞培養系を用いた卵子や精子の分化の報告はいくつかなされているが、正常発生におけるメカニズムの理解なしには到底応用は不可能である。生殖細胞の発生分化のメカニズム解明は ES あるいは iPS 細胞からの in vitro 分化系の確立に貢献する。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Suzuki A, **Sagai Y**. Nanos2 suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. *Genes & Develop.* 22, 430-435, 200
- Tsuda, T. Sasaoka, Y. Kiso, M. Abe, K. Haraguchi, S. Kobayashi, S. and **Sagai, Y**. Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science* 301:1239-1241, 2003.

【研究期間と研究経費】

平成21年度－25年度

160,000千円

ホームページ等

<http://www.nig.ac.jp/labs/MamDev/home-j.html>

【基盤研究(S)】
生物系(農学)



研究課題名 tRNA介在領域の分解能欠損による
植物ミトコンドリア病発生機構

香川大学・農学部・教授

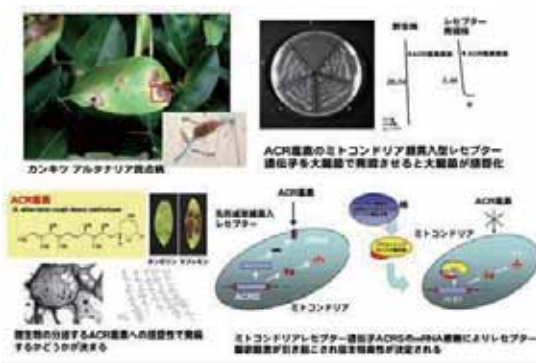
あきみつ かずや
秋光 和也

研究分野： 植物病理学

キーワード： 遺伝子、植物、ミトコンドリア、宿主特異的毒素

【研究の背景・目的】

宿主特異的 ACR 毒素の作用機構と毒素レセプター研究で、ACR 毒素がラフレモン等の特定のカンキツ品種にのみ NAD⁺等のミトコンドリア補因子の漏出による TCA 回路の停止や酸化的リン酸化の脱共役を誘起し、ACR 毒素に対する感受性はミトコンドリアゲノムにコードされる毒素のレセプター遺伝子 *ACRS* で決定され、毒素への感受性/抵抗性は *ACRS*mRNA へのプロセッシングの有無により決定されることを明らかにした。



本研究では、*ACRS*mRNAプロセッシングに関与する30kDタンパクのプロモーター解析、本30kDタンパクを中心としたmRNAプロセッシング複合体全容の解明、ACR毒素・ACT毒素合成遺伝子クラスターの詳細解析と他の宿主特異的毒素合成遺伝子クラスターとの比較解析を中心に研究を進め、植物病原菌と宿主植物間における特異性決定機構を解明する。

【研究の方法】

本研究で単離した *ACRS*mRNA 結合 30kD タンパク遺伝子の転写様式を検討すると、本タンパク遺伝子は毒素抵抗性品種からは発現が確認されるが、感受性品種からは確認されない。そこで、毒素抵抗性・感受性品種からそれぞれ本遺伝子プロモーター領域を単離し機能解析を進める。

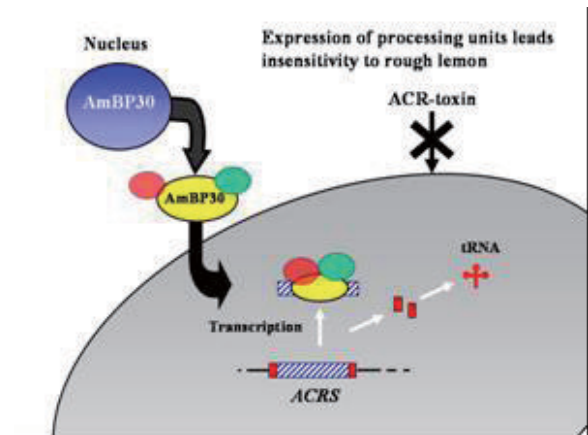
ACR 毒素レセプター遺伝子 *ACRS* の mRNA に特異的に結合する 30kD タンパクは、RNA 分解タンパク複合体の中のターゲット RNA 認識サブユニットと考えている。そこで複合体タンパク解析技法を用いて、RNA 分解タンパク複合体の全容を解明する。

さらに、本研究では ACR・ACT 毒素合成遺伝子クラスターが座乗する小型染色体配列を決定してゲノム解析を行う。

【期待される成果と意義】

本研究は、カンキツミトコンドリアゲノムの tRNA-A1a の介在領域に座乗する、ACR 毒素レセプター遺伝子転写物の修飾による特異性決定機構と、リガンドである ACR 毒素合成遺伝子クラスターの解明を目指す研究目標である。

ミトコンドリア遺伝子転写物の修飾で発病の有無が決定される極めて興味深い研究例であり、植物ミトコンドリア病発症機構に関する画期的な新知見を提供することが期待される。欠損しているミトコンドリア遺伝子転写物の修飾因子の相補で、病害耐性となる可能性がある。



【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Ohtani K, Yamamoto H, Akimitsu K. (2002) Sensitivity to *Alternaria alternata* toxin in citrus because of altered mitochondrial RNA processing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:2439-2444.
- Miyamoto, Y., et al. (2008) Functional Analysis of a Multicopy Host-Selective ACT-Toxin Biosynthesis Gene in the Tangerine Pathotype of *Alternaria alternata* Using RNA Silencing. *Mol Plant Microbe Interac* 21:1591-1599.

【研究期間と研究経費】

平成21年度－25年度

82,200千円

ホームページ等

<http://www.ag.kagawa-u.ac.jp/plantpathology/index.html>



研究課題名 植物の無機栄養ホメオスタシスと成長の統合的理解と仮説検証

東京大学・生物生産工学研究センター・准教授 藤原 とおる
ふじわら とおる
藤原 徹

研究分野：植物栄養学

キーワード：無機栄養、輸送体、制御、定量的モデル

【研究の背景・目的】

私たちの生活は植物に依存しています。植物は食料、医薬品、建築資材、衣類などを提供してくれるだけでなく、環境保全にも役立ちます。植物がこのような素晴らしい役割を果たすことができるのは、人類とは違って植物が土壌から吸収する無機元素に依存して生育できるためです。

17種類の元素が植物の生育に必須であることが知られています。これらの元素の多くを植物は土壌から吸収していますが、土壌は様々な要因で生成しますので、植物の必要とする元素が少なすぎたり多すぎたりすることが多いです。植物はどの元素が足りない(あるいは多すぎる)かを感知し、元素の取込みや排出の速度を変化させたりするべく細胞内の濃度を一定にしようとします。これが無機栄養ホメオスタシスです。この能力があるために様々な土地に植物は生育できます。

本研究は植物がどのように無機栄養環境を感知し、その吸収や輸送を制御しているかについて、植物個体全体としての理解を深めることを目的としています。

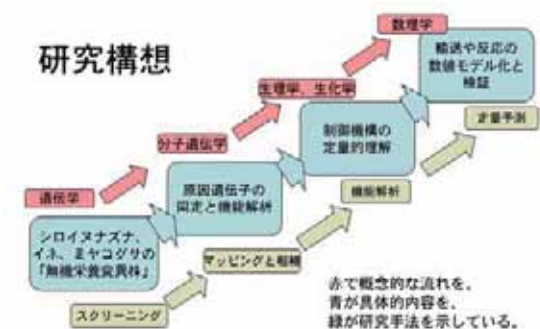
私たちはこれまでに、生物界で初めてのホウ素のトランスポーターをシロイヌナズナという植物の変異株を利用して見つけました。変異株というのは、普通の植物と比べてある機能が失われた植物のことで、ホウ素をうまく葉に送ることのできない変異株の原因遺伝子がホウ素のトランスポーターをコードしていました。これをきっかけに、いくつかのホウ素輸送を担う細胞膜タンパク質を見つけ出し、それらの役割を明らかにしてきました。さらには、このような細胞膜タンパク質を人為的に多く作らせることによって、ホウ素が少なすぎたり、多すぎたりする環境でも生育できる植物を作り出すことに成功してきています(図)。



BOR4を過剰発現させる遺伝子を導入したシロイヌナズナの独立複製耐性高株(A-G)を2株ずつ、10 mMのホウ酸を含むホウ酸過剰環境で17日間の生育させたもの。BOR4の発現はAが最も低く、順にGが最も高い。非形質転換株(WT)は発芽後に生育を停止してしまっているが、いずれの形質転換株も生育改善が見られる。生育改善の程度はBOR4の発現が強いものほど高い傾向が認められた。Bar, 10mm

【研究の方法】

本研究では、ホウ素に限定せず、様々な栄養素についての変異株を検索し、得られた変異株についての分子遺伝学的な解析を行うことを通じて無機栄養素のホメオスタシス機構を明らかにしていきます。また、ホウ素については、複数の輸送体の役割分担を考えながら、植物体全体におけるホウ素の輸送の定量的なモデルを作って、栄養環境に応じて植物がどのように無機元素輸送を制御し、植物体全体としての成長に結び付けているのかを理解します。



【期待される成果と意義】

本研究を通じて新しい無機元素のホメオスタシス機構が明らかになり、植物全体としての輸送制御のいわば「設計図」を理解することができると期待されます。このような「設計図」の理解は、植物の持つ機能をさらに強化し、ひいては食糧問題、環境問題にも役立つものと考えています。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Takano, J., Miwa K, Fujiwara, T. Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters. *Trends in Plant Science*, 13: 451-457. (2008)
- Miwa, K., Takano, J., Omori, H., Fujiwara, T. Plants tolerant of high boron levels. *Science* 318,1417 (2007)

【研究期間と研究経費】

平成21年度-25年度

160,700千円

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/ppk/home/Fujiwara.html>



研究課題名 スプライシング因子の新機能に関する化学遺伝学研究

独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・主任研究員 よしだ みのる
吉田 稔

研究分野：農学

キーワード：スプライシング、イントロン、転写、核-細胞質感輸送、非コードRNA

【研究の背景・目的】

人類も含めた真核生物では、DNA から転写された mRNA 前駆体 (pre-mRNA) には、アミノ酸配列の暗号情報を持たないイントロン (介在配列) が存在する。このイントロンを取り除き、残りの部分を結合して完全な配列を示す成熟型 mRNA を作るスプライシングは、正しい遺伝子発現に必須であると同時に異なるパターンを示すことによって遺伝子発現の多様性を担うなど、高等生物の進化の過程にも重要な役割を果たしたと考えられている。一方で近年、RNA の新大陸が発見され、膨大な数のノンコーディング RNA (ncRNA) の存在が示されたが、同時にこれまで意味を持たないと思われてきたイントロン配列中にも ncRNA である miRNA や snoRNA がコードされていることが徐々に明らかにされ、イントロンの持つ新しい機能にも注目が集まりつつある。しかし、スプライシング反応を阻害剤等によって制御することが困難であったため、イントロンの機能解析は思うように進んでいないのが現状である。我々は抗がん活性物質 Spliceostatin A (SSA) の作用機序研究から、SSA がスプライソソーム構成因子 SF3b に結合してスプライシング反応を阻害することを見いだした。SSA は一部の pre-mRNA の翻訳、ncRNA の局在・安定性変化、クロマチン修飾変化などを誘導することから、SF3b が単にスプライシング反応を担うだけでなく、様々な生体機能に関与すると考えられる。そこで本研究は、SSA を利用したケミカルバイオロジーの手法によりこれまで不明であったスプライシング因子とイントロンの新たな機能を明らかにしようとするものである。

【研究の方法】

SSA の細胞内標的として我々が見いだしたスプライシング因子複合体 SF3b の機能について、以下の 4 点に絞って研究を行う。すなわち、SF3b の (1) mRNA 監視機構における役割、(2) 転写とクロマチン調節における役割、(3) ncRNA 調節における役割、(4) 核小体および核内ドメインの機能と構造における役割である。(1) では SF3b がどのようにイントロンを含む mRNA を認識し、どのような機構で核内繫留をするのかについて明らかにする。(2) では、

SSA 処理で引き起こされる転写とクロマチン構造の変化を詳細に解析し、SF3b がどのような機構でグローバルな遺伝子発現制御を行っているのかを解明する。(3) では核内 ncRNA である Gomafu や Xist の局在異常等の分子機構を解明する。(4) では SSA によって動物細胞では SC35 核内スペックル、分裂酵母においては核小体の構造異常を観察しており、すでにわれわれが取得に成功した分裂酵母の全遺伝子発現系 ORFeome を用いてその機構を明らかにする。

【期待される成果と意義】

SSA は世界初の小分子スプライシング阻害剤であることが判明したが、同時に細胞周期阻害タンパク質 p27 などの pre-mRNA からの翻訳を引き起こし、イントロン配列由来のタンパク質を生成させることも明らかになった。このことは SSA の処理により、pre-mRNA を核内に繫留する機構 (nuclear retention) も同時に阻害されたことを意味する。すなわち、SSA を用いてこれまで不明であった nuclear retention の分子の実態を明らかにできる可能性がある。また、さらに SSA は転写やクロマチン修飾にも影響を与えていること、核内の ncRNA の局在や安定性を変化させること、分裂酵母において核小体の形態異常を引き起こすなど多様な表現型を示すことから SF3b が多様な機能的役割をもっているか、あるいは蓄積したイントロン配列の潜在的な機能によるものと推定される。これを解明することによりスプライシング因子とイントロンの多面的役割を明らかにできると期待される。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Kaida et al. *Nature Chem. Biol.* 3: 576-583, 2007
- Lo et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 364: 573-577, 2007
- Matsuyama et al. *Nature Biotechnol.* 24: 841-847, 2006

【研究期間と研究経費】

平成 21 年度 - 25 年度
153,700 千円
ホームページ等

<http://www.riken.go.jp/r-world/research/lab/wako/chemi-gene/index.html>
<http://www.rikenresearch.riken.jp/frontline/573/>



研究課題名 二次イオン質量分析法による植物細胞における
生体分子三次元分布の可視化

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授 福島 和彦

研究分野: 生物系・農学・森林学・木質科学

キーワード: 組織構造・材形成、リグニン、抽出成分・微量成分、保存・木質文化

【研究の背景・目的】

本研究の目的は、飛行時間型二次イオン質量分析 (TOF-SIMS) を用いることによって、細胞や細胞壁内にあるがままに存在するあらゆる構成成分の分布を、選択的に分子レベルで可視化することを目的とする。植物の細胞の構造を、視覚的に、また化学的に理解することは、あらゆる代謝物の生合成を理解する上で非常に重要である。しかしながら、細胞内に存在する分子は、水可溶性である、また、極めて不安定であるなど、従来の方法では解析が困難であった。TOF-SIMS は、一次イオンの照射により試料表面から放出される二次イオンの化学構造と分布を測定する分析機器であり、特定の分子イオンの分布可視化が可能である。本研究では、これまで乾燥試料のみにおいて、十分な測定が可能であった TOF-SIMS 機器において、急速凍結した生体細胞を直接測定することが可能な仕様に、開発・改良をおこなう。それにより、生きた細胞におけるターゲット分子の位置と存在量を、化学的な処理を施すことなく可視化することを目指すものである。

【研究の方法】

本研究においては、急速凍結した試料を測定可能なシステムを、現有設備の TOF-SIMS (TRIFT III) 機器において設計・構築し、実際に稼働するような条件設定を確立させることが主軸となる (図1)。まず、急速凍結した試料をすぐに TOF-SIMS 測定に移すための、窒素雰囲気下で測定室に導入する連結チャンバー構築が必要である。チャンバー内の圧力や温度の調節など、機器ハード面での設計をおこなう。次に、凍結試料測定に最適な条件の検討を、実際に急速凍結した植物試料を測定して調整する。このとき、植物細胞壁中のすでに同定した植物細胞壁の化学成分 (リグニン、多糖、抽出成分等) の分子イオンを用いて評価する。また、一次イオンビームの選択・調整をおこない、凍結細胞の高解像度測定の達成を目指す。さらに、試料表面を高解像度で測定可能な電子顕微鏡の導入と、測定する試料面の容易な面出しが遠隔操作で可能なスライディングマイクロトム等の開発をおこない、急速凍結した生体試料測定技術の確立を目標とする。

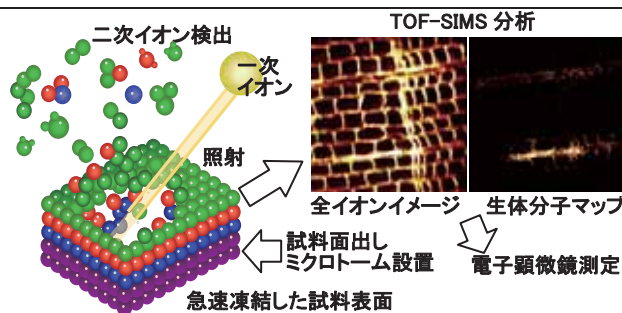


図1. TOF-SIMS 分析システムの概念図

【期待される成果と意義】

これまでに、生体試料における生体有機分子イオンのイメージング (分布可視化) は、いまだほとんど報告例がない。この理由として、高真空下において、凍結した生体試料から、生体分子イオンを細胞レベルで検出する難しさが挙げられる。本研究における急速凍結生体試料測定システムの確立の達成により、植物細胞に特有な、液胞の内容物や細胞壁の詳細な化学分析が可能となる。これによって、これまで測定が困難であった水可溶性物質の分布や、貯蔵物質の輸送経路など、生きたままの細胞における生体物質分布の可視化が期待される。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- ・ K. Saito, T. Mitsutani, T. Imai, Y. Matsushita, K. Fukushima, Discriminating the indistinguishable sapwood from heartwood in discoloured ancient wood by direct molecular mapping of specific extractives using ToF-SIMS, *Anal. Chem.*, **80**, 1552-1557 (2008)
- ・ 齋藤香織, 福島和彦, TOF-SIMS の植物細胞壁化学への応用, 植物化学調節学会誌「植物の生長調節」, **43**, 156-163 (2008)
- ・ K. Saito, T. Kato, Y. Tsuji, K. Fukushima, Identifying the characteristic secondary ions of lignin polymer using ToF-SIMS, *Biomacromolecules*, **6**, 678-683 (2005)

【研究期間と研究経費】

平成21年度-25年度

85,100千円

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~lignin/>

【基盤研究(S)】 生物系(農学)



研究課題名 最新の生理生態情報に基づくウナギ 大量種苗生産技術の実現

東京大学・海洋研究所・教授

つかもと かつみ
塚本 勝巳

研究分野：農学

キーワード：増養殖，種苗生産

【研究の背景・目的】

世界的に激減を続けるウナギの資源回復と養殖用種苗の安定供給を図るため、これまで40年以上にも亘って、ウナギ人工種苗生産技術の開発研究が進められてきた。しかし、その実用化の目処は、未だ立っていない。そこで本研究では、実用に堪えるウナギの大量種苗生産技術を開発する事を目的に、これまでとは全く異なる発想でこの問題に取り組み。すなわち、産卵場の特定、産卵親魚の捕獲、仔魚の生態解明など、最新のウナギ研究の急展開によって得られる様々な生態学的、生理学的新知見を積極的に技術開発に取り込んで、自然の生理生態に基づく(1)親魚催熟法の確立、(2)卵質の改善、および(3)仔魚の新飼育法の考案を行う。これらを総合して、ウナギの大量種苗生産技術を実現する。

【研究の方法】

野外の生態観察と室内の開発研究を平行して進め、ウナギの種苗生産技術を開発する。

(1) 成熟過程：卵巣で発現する遺伝子群について、全長cDNAサブトラクション法を用いて、差分化cDNAライブラリーを作製する。これを基にマイクロアレイを作製し、人工魚と天然魚の卵巣における遺伝子発現を網羅的に解析する。

(2) 産卵過程：自発産卵技術を改善し、良質卵を大量に得るために、大型水槽中で暗視野ビデオシステムによりウナギの産卵行動を観察する。放卵放精の引き金機構を明らかにする。

(3) 発育過程：仔魚のホルモン試料を塩類細胞に特異的なナトリウムポンプに対する抗体を用いて検出し、成長に伴う浸透圧調節の発達過程と調節機構を明らかにする。天然レプトの初期餌料の探索と新しい人工餌料の開発を行う。天然の生理生態情報を基に、ウナギの大量種苗生産を可能にする仔魚飼育システムを開発する。

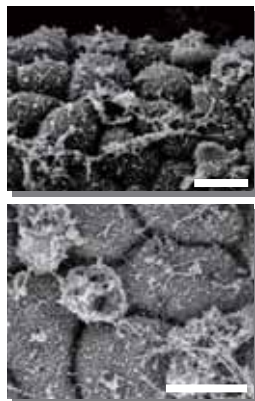


図3 ウナギの消化管上皮のSEM写真

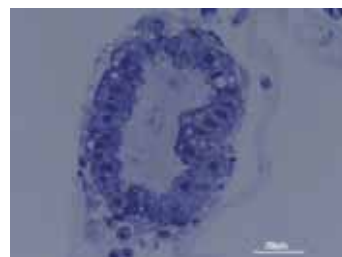


図4 ウナギ・プレプトセファルス(全長5.2mm)の腸上皮

【期待される成果と意義】

世界で初めてホルモンを使わないウナギ催熟技術を開発し、卵質を改善する。これによって健全な仔魚が大量に得られる。天然仔魚の餌料探索結果に基づき、従来のサメ卵主体の餌料に代わる新しい初期餌料を考案する。これにより初期生残率と成長・発育の大幅な改善が期待できる。従来の手間のかかる小規模なサメ卵飼育法とは全く違った発想で、新しい飼育システムを開発を行う。これにより、実験的小規模飼育から脱皮し、実用に耐える大量種苗生産が実現する。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Tsukamoto, K., Spawning of eels near a seamount. *Nature*, 439 (7079). 929, 2006.
- Tsukamoto, K., Oceanic migration and spawning of anguillid eels. *Journal of Fish Biology*, in press, 2009.
- Tsukamoto, K., Y. Yamada, T. Kaneko et al., Positive buoyancy in eel leptocephali: an adaptation for life in the ocean surface layer. *Marine Biology*, 156, 835-846, 2009.
- Kaneko, T., S. Watanabe & K. M. Lee, Functional morphology of mitochondrion-rich cells in euryhaline and stenohaline teleosts. *Aqua-BioScience Monograph*, 1, 1-62, 2008.
- Aoyama, J., Life history and evolution of migration in catadromous eels (Genus *Anguilla*), *Aqua BioScience Monograph*, 2, 1-42, 2009.

【研究期間と研究経費】

平成21年度－25年度

156,300千円

ホームページ等

<http://www.fishcol.ori.u-tokyo.ac.jp/homepage.data/Components/top.html>

【基盤研究(S)】

生物系(農学)



研究課題名 哺乳類フェロモンによる生理機能および行動の制御法開発

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

もり ゆうじ
森 裕司

研究分野：生物系・農学・畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：機能性物質

【研究の背景・目的】

フェロモンの作用は強力で、受け取った個体の脳機能に大きな影響を与え、行動や生理状態を変えてしまう。しかし哺乳類のフェロモンについてはまだ多くの部分が謎に包まれている。

本研究では、二種類のプライマーフェロモン分子（反芻家畜の雄効果フェロモンとげっ歯類の警報フェロモン）の単離精製・構造決定と合成を端緒として、フェロモンの産生・分泌機構、フェロモンの受容機構、フェロモンによる脳機能の修飾メカニズムについて解析を行い、哺乳類におけるフェロモンを介した化学的情報通信システムの全容解明と応用技術開発の基盤形成を目的に掲げた。

【研究の方法】

雄効果フェロモンおよび警報フェロモンについて以下の各項目の研究を進める

[1] 反芻家畜の雄効果フェロモンについて

- ① 雄効果フェロモン有効成分の決定と光学異性体を含む類縁物質の合成
- ② 雄効果フェロモンの受容体と神経回路の同定および中枢作用機構の解明
- ③ 雄効果フェロモン産生機構の解明
- ④ 合成雄効果フェロモンによる野外試験の実施

雄効果フェロモンの脳神経回路図

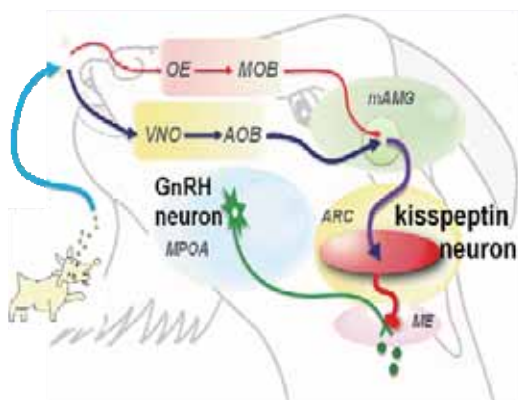
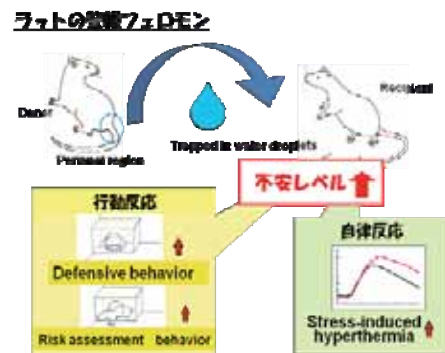


図1 雄効果フェロモンは嗅鼻系および主嗅覚系で受容され、扁桃体で情報統合されて GnRH パルスジェネレーターの本体と目される視床下部キスペプチンニューロンに作用すると推定される。

[2] げっ歯類の警報フェロモンについて

- ⑤ 警報フェロモンの構造決定と活性評価
 - ⑥ 警報フェロモン受容体の同定
 - ⑦ 警報フェロモンの中枢作用機序の解明
 - ⑧ 反対作用を持つ安寧フェロモンの探索研究
- 図2 警報フェロモンは不安反応を引き起こす



【期待される成果と意義】

フェロモンの産生から受容そして中枢神経系への作用に至る一連のメカニズムが解明されることで哺乳類におけるケミカルコミュニケーションの謎が解き明かされるとともに、新たな手法による Clean/Green/Ethical な動物機能・行動制御技術の開発にもつながることが期待される。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Murata K., Wakabayashi Y., Kitago M., Ohara H., Watanabe H., Tamogami S., Warita Y., Yamagishi K., Ichikawa M., Takeuchi Y., Okamura H., Mori Y. 2009 Modulation of GnRH pulse generator activity by the pheromone in small ruminants. J Neuroendocrinol 21: 346-350.
- Kiyokawa Y., Kikusui T., Takeuchi Y., Mori Y. 2007 Removal of the vomeronasal organ blocks the stress-induced hyperthermia response to alarm pheromone in male rats. Chem Senses 32: 57-64.

【研究期間と研究経費】

平成21年度－25年度

157,800千円

ホームページ

<http://www.vm.a.u-tokyo.ac.jp/koudou/j-home.htm>

【基盤研究(S)】 生物系(農学)



研究課題名 バイオマス系完全分散ナノフィブリルの創製と 環境対応型材料への変換

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

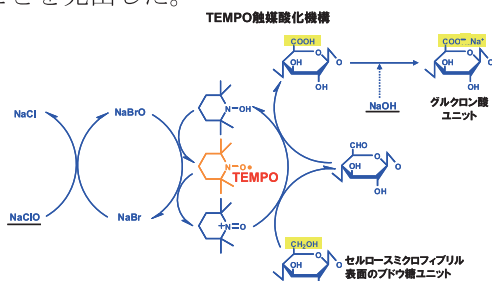
いそがい ありき
磯貝 明

研究分野：農学

キーワード：バイオマス、セルロース、キチン、ナノフィブリル、TEMPO 触媒酸化

【研究の背景・目的】

循環型社会の構築のためには、再生産可能なバイオマスの更なる有効利用が求められている。これまでの研究成果から、TEMPO (2,2,6,6-テトラメチルピペリジニル-1-オキシラジカル) 触媒酸化によって得られるセルロース酸化物が、先端ナノ材料に展開できる十分なポテンシャルを有していることを見出した。



本研究では、その方法および荷電反発型のナノ分散原理を基盤とし、セルロース、キチン、フィブロインなど豊富な結晶性バイオマスのダウンサイジングによる完全分散ナノフィブリル化条件の検討と、得られたバイオ系新規ナノ素材のナノ構造、生分解性、複合化による機能解析を進める。それらの結果に基づき、エレクトロニクスや医療材料、環境浄化・エネルギー材料など、環境対応型の新規先端材料に変換して応用展開するための幅広い基礎的知見の蓄積と科学的解析を進め、バイオマス系ナノテクノロジー関連学術分野を拡大させ、成果の一部は産学連携によって社会に還元していくことを目的とする。また、本開発手法をバイオマス関連の固体構造あるいは生成メカニズムなど、未解決の基礎科学分野への解析手法としての適用も検討し、その解決を目指す。

【研究の方法】

各種セルロース、キチン、フィブロイン試料に中性～弱酸性条件でTEMPO触媒酸化処理を行い、重合度、カルボキシル基量、アルデヒド基量、結晶化度等を因子として生成物の構造を検討する。得られた各種TEMPO酸化物の水中解繊処理によってナノフィブリル/水分散液を調製し、透過型電子顕微鏡、走査プローブ顕微鏡で官能基の分布を測定することにより、ナノ構造解析を行う。フィブリル分散液から調製したフィルムの物性を評価し、TEMPO酸化条件、解繊条件等から機能材料としての特性と課題の抽出を行う。ナノフィブリル素材の生分解性挙動、生分解機構を検討する

ための試料調製を行う。また、ポリ乳酸、酢酸セルロース等と、バイオ系新規完全ナノ分散フィブリルを複合させたオールバイオマス材料の調製条件を検討し、熱特性、光学特性、力学物性を、ナノレベルの構造解析、フィブリル配向度、分布状態などから特性を解析する。一方、樹種や起源の異なるセルロース、キチンから本ナノフィブリル化手法を用いて、真のフィブリル幅を測定し、植物や甲殻類の進化の過程との関連で解析する。

【期待される成果と意義】

本方法で開発したセルロースおよびキチンナノフィブリルは、他の方法では達成できない高結晶化度を有し、超極細幅の新規バイオマス系ナノ素材で



あり、自然界に豊富に存在する構造多糖の固体構造特性を利用して調製される。また、TEMPO触媒酸化あるいは表面荷電付与により、その表面には高密度で荷電基が存在し、それらを接点とした表面改質の多様性という観点からも、他の素材にはない高い独自性と機能性が発現される。従って、環境適合性を有し、先端ナノ材料分野として応用可能な材料に変換できる。本研究の進展により、バイオマス系ナノテクノロジー関連学術分野が格段と進展し、再生産可能なバイオマスを原料とする循環型社会対応型の新規ナノ材料の開発、関連研究・産業分野の発展・創成・寄与につながる。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Saito, T., Kimura, S., Nishiyama, Y., Isogai, A., "Cellulose nanofibers prepared by TEMPO-mediated oxidation of native cellulose", *Biomacromolecules*, **8**, 2485-2491 (2007)
- Fukuzumi, H., Saito, T., Kumamoto, Y., Iwata, T., Isogai, A., "Transparent and high gas barrier films of cellulose nanofibers prepared by TEMPO-mediated oxidation", *Biomacromolecules*, **10**, 162-165 (2009).

【研究期間と研究経費】

平成21年度～25年度
151,500千円

<http://psl.fp.a.u-tokyo.ac.jp/hp/>

<http://psl.fp.a.u-tokyo.ac.jp/hp/isogai/IsogaiJ.htm>

【基盤研究(S)】

生物系(医歯薬学I)



研究課題名 遷移金属触媒合成を基盤とする有機イオウ・リン有用物質の高機能化と環境調和利用

東北大学・原子分子材料科学高等研究機構・教授 やまぐち まさひこ
山口 雅彦

研究分野: 有機化学

キーワード: 触媒, 環境調和, ヘテロ元素, 有機合成化学

【研究の背景・目的】

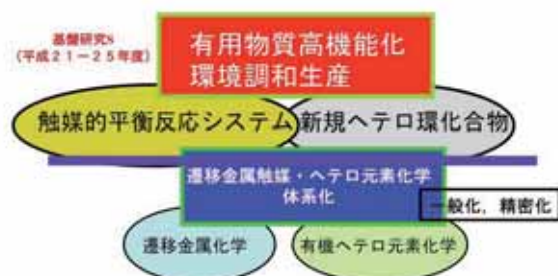
省エネルギー・省資源と二酸化炭素排出削減などの環境調和社会構築に対する社会的な要請が強い。医薬産業を含む化学産業が排出する産業廃棄物は鉄鋼業、紙・パルプ産業に続いて製造業で第3位であり、二酸化炭素排出およびエネルギー使用量は鉄鋼業に次ぐ(平成16年度)。医薬品と電子材料製造における廃棄物量は化学産業全体の約50%を占め(2006年実績)、エコファクター(廃棄物量/生産量の比)の観点では1トンの製品を製造するのに100トンレベルの廃棄物を出しているのが現状である。基礎化成品の製造プロセス改良は限界に近付きつつあるので、医薬品・電子材料製造プロセスの改善の必要性が高い。

しかし、現在利用されている物質変換では本質的に大量のエネルギー消費と廃棄物発生を防ぐことができない。一般に反応のエネルギー障壁を乗り越えるためには加熱するか、反応性の高い反応剤を化学量論的に用いて反応物のエネルギー状態をあげることが行われる。前者で解決できる物質変換は限られる。後者は必然的に反応剤由来する副生成物が大量に生じる。反応制御のために低温反応を行いさらにエネルギー消費することもある。従って、環境調和した有用物質生産の観点から化学反応自体の効率化が必要である。

【研究の方法】

この目的を達成するために、遷移金属触媒反応の開発を基盤として医薬品と機能性材料で重要な有機イオウ・リン化合物の高効率で環境調和した活用を実現する。1) 高活性遷移金属触媒反応の開発, 2) 平衡反応システム制御, 3) 新規含イオウ・リンヘテロ環化合物の系統的合成法の開発, 4) 医薬品と機能性材料の高機能化, 5) 遷移金属触媒分解による物質循環に関する研究を行う。

有機イオウ・リン有用物質の高機能化と環境調和利用



【期待される成果と意義】

イオウ・リンは周期表第3周期ヘテロ元素であり、これらの元素と炭素との結合をもつ有機イオウ・リン化合物は、医薬品、農薬、光学材料、導電性材料、感光材料などの機能性物質に用いられている。イオウ・リン原子は同族第2周期の酸素・窒素原子に比べて大きくソフトであるので、機能発現において大きな違いを生じる。例えば、生体内のタンパク質や核酸は主として酸素・窒素からなる。従って、生物活性発現を調節する目的で用いられる合成医薬品の開発において、酸素・窒素と似て非なるイオウ・リンを含む化合物には大きな可能性がある。しかし、現在の有機イオウ・リン化合物の利用は必ずしも十分ではない。この理由は、効率的で環境調和した合成法が十分に提供されていないこと、それにとまって合成の容易なヘテロ元素化合物しか取り扱っていないためである。従って、有機イオウ・リン化合物を合成する簡便で汎用的かつ環境調和した新方法を開発することができれば、新しいヘテロ環構造の利用が飛躍的に進み、医薬品等の開発に貢献できると期待される。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- ・ M. Arisawa, M. Yamaguchi, *J. Synth. Org. Chem., Jpn.*, **65**, 1213 (2007).
- ・ M. Arisawa, M. Yamaguchi, *Pure. Appl. Chem.*, **80**, 993 (2008).

【研究期間と研究経費】

平成21年度-25年度
159,000千円

ホームページ等

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~sekkei/sekkei-j.html>

【基盤研究(S)】

生物系(医歯薬学I)



研究課題名 インテリジェント人工核酸を搭載したナノ DDS による革新的分子標的治療薬の研究

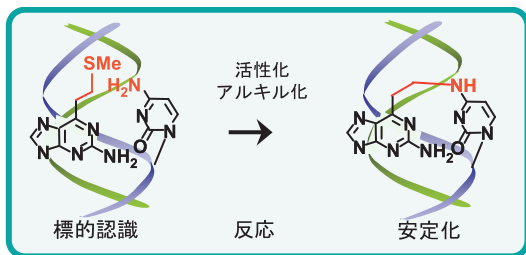
九州大学・大学院薬学研究院・教授 **ささき しげたか**
佐々木 茂貴

研究分野：創薬化学

キーワード：核酸医薬、薬物送達、ナノメディスン、糖尿病、疾患モデルマウス

【研究の背景・目的】

アンチセンスや siRNA などの核酸医薬は標的 mRNA に作用して遺伝子発現を効果的に抑制する。また、核酸医薬の新しい作用として抑制的な役割の miRNA を阻害して結果的に発現を促進する効果が注目されている。しかし、これまで認可された核酸医薬は2種類しかなく、安定性を高める化学修飾技術、標的臓器への達性を高める DDS 技術、効果的な細胞内作用の実現など多くの課題が残されている。本研究では、有機合成化学、薬物到達学および内分泌代謝学を専門とするグループが連携し、2型糖尿病を具体的な標的として核酸医薬の基盤技術を確認する。

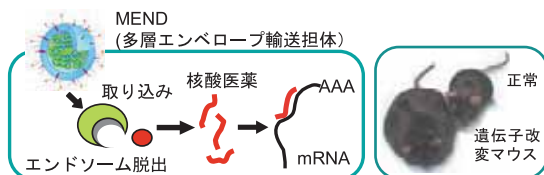


標的 RNA を認識して機能する人工核酸の一例
(1塩基レベルの特異性および阻害効果の向上)

【研究の方法】

本研究では、糖尿病など複数遺伝子が関与する疾患に対する次世代医薬の基盤構築を目的に、疾患関連遺伝子を正確に標的化できる核酸医薬を、臓器特異性をもつエンベロープ型ナノ輸送システムに搭載したナノ分子標的薬の創製を目指し、次の項目について検討する。

- (1)核酸医薬の設計 (佐々木 G、永次 G、新藤 G)
- (2)標的遺伝子の決定 (原島 G、野村 G)
- (3)目的臓器への輸送 (原島 G)
- (4)疾患モデル動物による検証 (野村 G)



多層構造エンベロープ型ナノ輸送担体による人工核酸の細胞内輸送
疾患モデルマウス

核酸医薬の開発は、佐々木 (九大院薬)、永次 (東北大多元研)、新藤グループ (九大先導研) が共同で分担し、尿病関連遺伝子を標的化するインテリジェント人工核酸の合成、非細胞、細胞系試験に

よる機能評価を担当する。原島グループ (北大院薬) との共同でナノ輸送デバイスへの搭載、野村グループ (九大病院) との共同での疾患モデル動物での機能検証実験へと展開する。

体内輸送システムの開発は原島グループ (北大院薬) が担当し、高い肝臓指向性をもつエンベロープ型ナノ輸送システムを用いて核酸医薬の治療効果を検証する。野村グループ (九大病院) は糖尿病発症モデルマウスを用いたナノ分子標的薬の治療効果の検証を担当する。さらに新たに作成した遺伝子操作マウスに対してナノ分子標的薬を用いることによって発症における遺伝子の役割を解明し、治療に最適な標的を決定する。

【期待される成果と意義】

本研究では、疾患関連 RNA を分子標的とするインテリジェント核酸医薬を臓器標的性を持つエンベロープ型ナノ輸送システムに搭載して、疾患モデル動物で検証を行い、ナノ分子標的薬の創製を目指す。具体的には2型糖尿病遺伝子を標的とすることにより糖尿病に対するナノ分子標的薬の基盤が構築されることが期待される。さらに複数遺伝子の標的化が実現されれば、多因子疾患に対するマルチ標的薬の新しい展開の可能性が期待される。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Ali M. M., Oishi M., Nagatsugi F., Mori K., Nagasaki Y., Kataoka K., Sasaki S., Intracellular Ability of an Inducible Alkylation System to Exhibit Antisense Effects with Greater Potency and Selectivity, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 3136-3140 (2006).
- A. El-Sayed, IA. Khalil, K. Kogure, S. Futaki, H. Harashima, Octaarginine- and octalysine-modified nanoparticles have different modes of endosomal escape. *J Biol Chem.* **283**, 23450-61 (2008).
- Goto Y, Nomura M, Tanaka K, Kondo A, Morinaga H, Okabe T, Yanase T, Nawata H, Takayanagi R, Li E. Genetic interactions between activin type IIB receptor and Smad2 genes in asymmetrical patterning of the thoracic organs and the development of pancreas islets. *Dev Dyn* **236**, 2865-74 (2007).

【研究期間と研究経費】

平成21年度－25年度

159,300千円

ホームページ等

<http://bioorg.phar.kyushu-u.ac.jp/>

e-mail:sasaki@phar.kyushu-u.ac.jp



研究課題名 電位センサードメイン蛋白群を基盤とする新たな膜電位シグナルの解明

大阪大学・大学院医学系研究科・教授 おかむら やすし
岡村 康司

研究分野：生物系 医歯薬学 基礎医学 生理学一般

キーワード：生体膜、チャネル、トランスポーター、能動輸送

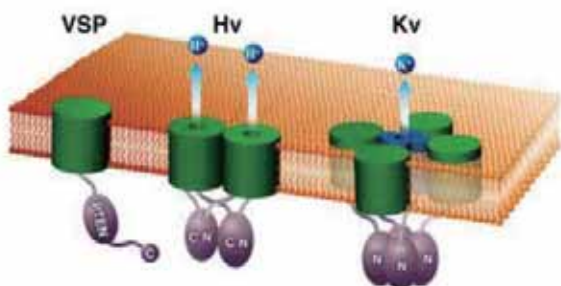
【研究の背景・目的】

電位センサーは神経や筋などにおいて、電氣的興奮を担う電位依存性イオンチャネルの重要な仕組みとして研究されてきた。我々は、電位センサーが従来の電位依存性イオンチャネルに限定されるものでなく蛋白モジュールとして多様な分子機能に使われていることを示し、これにより電位センサーがこれまでの「イオンチャネルの一部」という立場から「膜電位：化学シグナル共役複合体中のセンサー」という広い概念として再考されつつある。本研究では、これら電位センサードメイン蛋白を発現する細胞や組織から膜電位変化を計測するとともに、電位センサードメインを含むシグナル複合体の構築と機能を明らかにする。これにより生体が電気信号と化学信号を変換する仕組みとその生理的役割を解明することを目指す。

【研究の方法】

おもに以下の3つのアプローチにより研究を進める。

(1) 電位センサードメイン蛋白(電位依存性ホスファターゼVSP、電位依存性プロトンチャネルVSOP1またはHv、機能未定分子VSOP2)などについてタンパク分子の動作機構を、電気生理学、生化学、イメージングなどの手法を用いて解析する。VSOP1(Hv)については好中球やマクロファージで病原菌やアポトーシスした細胞を食食する際に活性酸素産生を担うNADPHオキシダーゼとの相互作用を明らかにし、オキシターゼ活性の電位依存的制御での役割を検証する。



(2) Mermaidは、電位依存性ホスファターゼVSPの電位センサードメインと蛍光分子をキメラとする蛍光蛋白である。また、電位センサードメイン蛋白の動作原理の解明と並行し、その知見に基づいて膜電位感受性蛍光プローブ分子の改良を行う。

(3) VSOP1(Hv)遺伝子を欠失した gene trap マ

ウスの免疫機能の解析を進める。更に細胞種特異的コンディショナルノックアウトマウスを確立し、免疫機能のフェノタイプを解析する。VSOP2のノックアウトマウスを確立し、生理機能に関する情報を得る。電位センサードメイン蛋白を元にして設計されたMermaidなどの蛍光プローブ分子を用いて、血液細胞、ニューロンなどから膜電位変化を計測し、正常マウスとノックアウトマウスの間で比較する。これらにより電位センサードメイン蛋白が関わる生理的文脈を明らかにする。

【期待される成果と意義】

電位センサードメイン蛋白の分子機構と生理的役割を明らかにし、新規プローブ分子による膜電位イメージング計測を行うことで、すべての細胞に必然的に存在する膜電位の生理的意義を見直すことに繋がるだろう。例えば、骨格筋での興奮収縮連関の実体であるL型Caチャネルとリアノジン受容体の「メカニカルカップリング」や受精現象での電氣的多精子拒否など、長く知られてきたイオンの出入りを伴わない膜電位シグナル伝達の理解につながる。VSPはCancer-testis抗原であり、またガン抑制遺伝子PTENとも類似しており、その解明は将来ガンができる仕組みやその制御のための研究へ波及する可能性がある。血液細胞に発現するVSOP1は、食食機能の制御や活性酸素産生の制御機構の理解を通して感染防御や免疫疾患病態の理解に貢献できる。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- A voltage sensor-domain protein is a voltage-gated proton channel. Sasaki M, Takagi M & Okamura Y. *Science*, 312(5773), 589-92. (2006).
- Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor. Murata Y, Iwasaki H, Sasaki M, Inaba K & Okamura Y. *Nature*, 435:1239-1243.(2005).

【研究期間と研究経費】

平成21年度－25年度

130,700千円

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/phys2/tououseiri/menu.htm>

【基盤研究(S)】

生物系(医歯薬学 I)



研究課題名 中枢神経系細胞間ネットワークにおけるシグナル機構の可視化解析

東京大学・大学院医学系研究科・教授 **飯野 正光** (いいの まさみつ)

研究分野: 医歯薬学

キーワード: 中枢神経、受容体・チャネル・シグナル情報伝達系

【研究の背景・目的】

中枢神経系は、ニューロンおよびグリア細胞間の複雑なネットワーク機構により機能を果たしており、この理解にはネットワークの基本機能解明が必須である。中枢神経系の細胞は複雑な形態をもち、細胞局所におけるシグナル伝達がネットワークの性質を決定している。従って、細胞局所のシグナル機構を解析できるシグナル分子可視化法は極めて重要である。また、Ca²⁺シグナルはシナプス可塑性を始めとする重要な中枢神経系機能に関与するが、Ca²⁺の未知機能は多数残されており、これを明らかにすることにより、ネットワーク機能を新たな側面から展望できる。本研究では、申請者の従来の成果をさらに発展させ、Ca²⁺シグナルの未知機能解明とシグナル分子可視化研究を介して中枢神経ネットワーク機能研究を格段に進め、ブレークスルーとなる成果をあげることを目的としている。

【研究の方法】

ニューロン・ニューロン相互作用とニューロン・グリア相互作用に焦点を絞り以下の研究を推進する。

- 1) IP₃-Ca²⁺シグナルの新機能探索: 先行研究において、IP₃ 脱リン酸化酵素による IP₃-Ca²⁺シグナルの新機能探索が可能であることを小脳で実証した。これを他の脳部位と他のネットワーク機構解析に展開する。
- 2) グルタミン酸動態解析: グルタミン酸は、シナプスにおける迅速な化学伝達を行うと同時にシナプス間隙外での細胞間相互作用に関与している。しかし、グルタミン酸シグナルの時空間分布については、直接的な解析は行われていない。そこで、新たなグルタミン酸プローブ (EOS) を用い、細胞間ネットワークにおけるグルタミン酸シグナルの可視化解析を行い、本領域の研究を全く新たな観点から推進する。
- 3) NO シグナル・Ca²⁺シグナル関連機構: シナプスにおける NO シグナル機構が、シナプス機能制御に

関与するメカニズムについて、分子機構と生理的および病態生理的意義を明らかにする。

【期待される成果と意義】

本研究は、申請者独自の研究成果に基づく研究手法を用いた特色ある研究であり、独創的な研究成果をあげて中枢神経系の機能理解に大きく貢献すると期待され、以下の成果が予想される。①グルタミン酸動態の可視化は、グルタミン酸のシナプス外動態を初めて明らかにする基本的研究成果として広く引用される業績になり、神経伝達物質の機能的意義を明らかにする上で必須の情報を提供すると考えられる。②NO シグナル・Ca²⁺シグナル関連機構解析は、NO に関連した生理機構あるいは病態の理解に直結すると期待できる。③ニューロンおよびグリア細胞の IP₃-Ca²⁺シグナルの意義を追究することにより、シナプス維持機構などの重要な細胞間相互作用について新たな発見が期待できる。以上により明らかになるネットワーク基本機構は、関連する研究領域に大きな波及効果をもたらすと期待できる。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- ・Furutani, K., Okubo, Y., Kakizawa, S. and Iino, M. Postsynaptic inositol 1,4,5-trisphosphate signaling maintains presynaptic function of parallel fiber-Purkinje cell synapses via BDNF. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 8528-8533, 2006.
- ・Okubo, Y., Kakizawa, S., Hirose, K., and Iino, M. Visualization of IP₃ dynamics reveals a novel AMPA receptor-triggered IP₃ production pathway mediated by voltage-dependent Ca²⁺ influx in Purkinje cells. *Neuron* 32, 113-122, 2001.

【研究期間と研究経費】

平成21年度－25年度

183,800千円

ホームページ等

<http://calcium.cmp.m.u-tokyo.ac.jp>

【基盤研究(S)】

生物系(医歯薬学I)



研究課題名 マウスモデルを用いた消化器癌転移の研究

京都大学・大学院医学研究科・教授 **武藤 誠** (たけとう まこと)

研究分野: 医歯薬学

キーワード: 分子腫瘍学

【研究の背景・目的】

癌による死亡の中で消化器癌の占める割合は最も高く、その遠隔転移を抑制することが重要課題となっている。本研究では、大腸癌の転移を抑制するための新たな治療標的を見出すことを目標とする。

【研究の方法】

1. 未分化骨髄球(imature myeloid cells: iMCs, 図1)による転移促進機構の解析

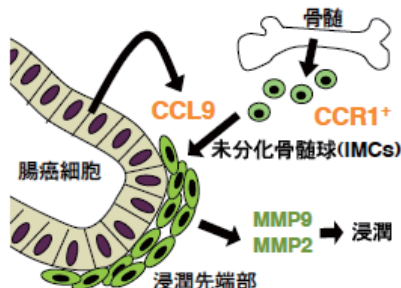


図1 iMCsは腸癌の浸潤を促進する

A) 大腸癌浸潤の水先案内をする iMCs の本体およびその転移促進機構をマウスモデルを用いて解明する。

B) ヒト大腸癌の転移における iMCs の役割を明らかにする。

C) ケモカイン受容体 CCR1 阻害薬の転移抑制効果をマウスモデルで検討する。

2. *Aes*/Notch による転移制御機構の解明

A) *Aes* の浸潤・転移抑制機能を、腸腫瘍モデルマウスを用いて個体レベルで検討する。

B) 大腸癌以外の癌の転移における *AES* の役割を検討する。

C) *AES* の発現抑制機構を解析し、*AES* の発現低下とヒト大腸癌患者の予後の相関を検討する。

D) *Aes* ペプチドの Notch シグナル抑制効果及び転移の治療・予防法を検討する。

3. 大腸癌進展の早期で重要なシグナル経路や分子が癌の転移の増大に果たす役割の解明

(A) Wnt シグナル経路による mTORC1 活性化の機序を解明する。また、転移巣拡大に対する Rapamycin 誘導体 RAD001 の影響を調べる。

(B) SMO が活性型 β -catenin の細胞内局在を制御する機序を解明する。

(C) 大腸癌転移巣における CDX2、p27 の発現と染

色体不安定性の指標である分裂後期染色体異常像の頻度 (Anaphase bridge index: ABI) との相関について解析する。

【期待される成果と意義】

本研究の特色は、我々が独自に見出した新たな知見に基づいてこれまでに報告のない転移制御機構を解明しようとしている点にある(図2)。また、本研究では臨床病状を技術的に可能な限り正確に反映したマウスモデルを用いることで転移の治療に直結しうる研究計画を立てている点も大きな特色の一つである。本研究によって従来の視点では見出せなかった新たな転移制御機構が複数同定され、消化器癌の転移を抑制するための治療戦略を指し示すことが出来ると期待される。



図2 癌細胞の転移過程と本研究計画の全体構想

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

・Fujishita, T., Aoki, M., Taketo, M.M. [他 2名] (2008) Inhibition of the mTORC1 pathway suppresses intestinal polyp formation and reduces mortality in *Apc*^{A716} mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 105:13544-13549. (1000 Faculty Paper)

・Kitamura, T., Aoki, M., Taketo, M.M. [他 9名] (2007) SMAD4-deficient intestinal tumors recruit CCR1⁺-myeloid cells that help invasion. *Nat. Genet.* 39:467-475.

【研究期間と研究経費】

平成21年度-24年度

159,300千円

ホームページ等

[http://www4.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/frameTOP\(J\).htm](http://www4.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/frameTOP(J).htm)

【基盤研究(S)】

生物系(医歯薬学 I)



研究課題名 CCR4-NOT デアデニレース欠損に伴う病態解析と新たな遺伝子発現制御機構

東京大学・医科学研究所・教授

やまもと ただし
山本 雅

研究分野： 医歯薬学

キーワード： 分子

【研究の背景・目的】

遺伝子発現は転写制御と転写後制御で巧みに調節されている。近年 microRNA や shRNA による転写後制御研究が進み、それと共に mRNA 分解制御が新しい角度から見直されている。本研究では、mRNA 分解制御の重要なステップを担うデアデニレースに着目し、有核生物の主要なデアデニレースである CCR4-NOT 複合体(図1)について、その構成成分



図1 mRNAのpoly(A)に作用するCCR4-NOT

の一つ一つを欠損するマウスを作成・解析し生理機能を確立する。その生理機能情報に基づき、CCR4-NOT 複合体と Tob 蛋白質や RNA 結合蛋白質、microRNA などの相互作用を解析し、CCR4-NOT デアデニレース複合体が標的 mRNA 種を認識し分解に導く新たな仕組みを明らかにする。

【研究の方法】

CCR4-NOT 複合体を構成する 10 種の蛋白質すべてについて、遺伝子改変マウスを作成し、解剖形態学・分子病理学により解析して個体レベルでの生理的意義を確立する。また培養細胞レベルでの CCR4-NOT 複合体の作用機構に関する分子細胞生物学的解析やプロテオミクスならびに構造生物学的解析による複合体形成・維持機構の解析を進める。これらの知見を合わせ、脱アデニル化機能の不全で発現が影響を受ける mRNA 種を炙り出しながら、CCR4-NOT デアデニレース複合体を介する mRNA 代謝・分解機構を、生理機能や細胞内シグナル伝達の中に俯瞰的に捕らえて理解する。

膨大な遺伝子発現解析結果や蛋白質相互作用解析結果の情報はバイオインフォマティクス研究者の協力を得て進める。戦略として CCR4-NOT 複合体構成成分のうちでも特にデアデニレース活性を示すサブユニットやアデニレース活性を直接制御することの分かっているサブユニットを欠損するマウスの作成・解析を優先する。Cnot7 デアデニレース欠損マウスは精子形成不全を示すことから、精巣等で発現が上昇している mRNA 種を microarray 法で探索しその中から poly(A)長が変化したり安定化したりしている mRNA を探し出す。またデアデニレース活性を調節する Cnot3 をコー

ドする遺伝子のヘテロ欠損マウスは痩せ形質を示し、肥満耐性であった。この形質に関連して発現量が変化している mRNA 群を探索し、見出した標的候補 mRNA については、その 3' UTR に結合しうる microRNA や蛋白質を同定し、それらと CCR4-NOT デアデニレース活性との機能連携を探り出す。同様の手法により他の Cnot サブユニット欠損マウスについても病態解析から明らかにされる生理機能に立脚して CCR4-NOT デアデニレース標的 mRNA を網羅し、普遍的な CCR4-NOT デアデニレース活性がどのような仕組みで特異性を発揮し標的 mRNA を識別するのかを、生理機能に基づいて明らかにする。

【期待される成果と意義】

細胞が外来刺激に応答して変化させる遺伝子発現のうちの半分以上が mRNA の安定性に依存していることからわかるように mRNA の安定性制御機構を明らかにすることは生命の仕組みの理解に大きく貢献する。本研究から、mRNA 代謝に関わる CCR4-NOT 複合体のこれまで未解明であった生理学的意義が明確になり、その結果として転写後制御の重要な仕組みが明らかになると期待される。本研究の成果は、生命現象の基幹である遺伝子発現(=mRNA 代謝)制御の中の mRNA サイレncing・mRNA 分解について、教科書レベルの知見をもたらす。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- ・ Yoshida Y, Tanaka S, Yamamoto T et al, Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts. *Cell* **103**, 1085-1097. (2000)
- ・ Oligo-astheno-teratozoospermia in mice lacking Cnot7, a regulator of retinoid X receptor beta, *Nature Genet* **36**: 528-533. (2004)
- ・ Morita M, Nakamura T, Yamamoto T. et al, Depletion of mammalian CCR4b deadenylase triggers increment of the *p27^{Kip1}* mRNA level and impairs cell growth. *Mol Cell Biol* **27**: 4980-4990. (2007)

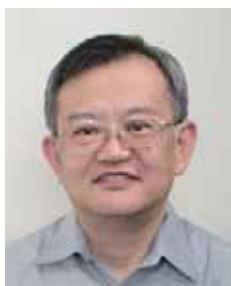
【研究期間と研究経費】

平成 21 年度 - 25 年度

159,200 千円

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/gannsig/>


研究課題名 液性免疫記憶の生成・維持・活性化機序

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任教授

 くろさき ともひろ
黒崎 知博

研究分野：免疫学

キーワード：免疫記憶

【研究の背景・目的】

免疫システムは、まずウイルスをはじめとする侵入異物を局所で感知し、一時防御機構を発動し、続いて全身に配置されたリンパ組織における効率的な防御反応を開始・継続しながら、タイムリーな終焉を迎える。さらには、「免疫記憶」により、予想される外来異物の再侵入への準備を可能にするとともに、再侵入に対して迅速に対応できるようになっている。

この「免疫記憶」機能を担うメモリーB・T細胞は一次免疫反応中に生成されるわけであるが、ナイーブ細胞とは異なり、長期の寿命を有し維持され、異物の再侵入（二次免疫）により迅速・効率的に、メモリーB細胞の場合、長期抗体産生細胞へと分化し、再侵入異物を速やかに排除する。このような機能的な重要性にもかかわらず、メモリーB細胞のユニークな機能（迅速反応性・長期寿命）を支える分子機序に関する研究はほとんど進展してこなかった。この点を明らかにするためには、まず、生体内でメモリーB細胞がどのような分化経路により生成されるのか、又、生成されたメモリーB細胞は生体内の何処に存在するのかは、明らかにされなければならない根源的課題である。

本研究では、従来の研究手法に加えて、メモリーB細胞の動態を *in vivo* で追跡する実験系の開発、を行い、これら実験手法を駆使して、この根源的課題を解決することを目的とする。

【研究の方法】

外来性抗原モデルとして、メモリーB細胞のトレースが最も確立しているNPを用いたハプテン抗原系を用いる。

メモリーB細胞の分化経路の検索に関しては、以下の実験手法を用いてアプローチする。メモリーB細胞は、従来、胚中心(Germinal Center; GC)B細胞から分化してくると考えられていたが、GC形成のないマウスでもメモリーB細胞が発生することより、この考えは再検討を要する重要な課題と考えられる。この課題解決には、GC-B細胞特異的プロモーターを用いて、このプロモーターが発現した後の細胞系列では蛍光蛋白が不可逆的に発現する Fate-mapping マウスを作成し、このマウスを用いて検定する。

メモリーB細胞の存在部位の同定に関しては以

下の方法を用いる。メモリーB細胞に特異的に発現する遺伝子を単離し、この遺伝子座位を用いて新規 fate-mapping マーカーを保持するマウスを単離する。このマウスでは、メモリーB細胞特異的に蛍光を発するようになる。この蛍光を発している細胞がリンパ節のどの部位に存在するかを蛍光顕微鏡を用いて詳細に観察していく。

【期待される成果と意義】

免疫記憶を応用した典型的な治療法はワクチン療法であり、安全かつ有効な新規ワクチン開発への、基盤的知見は未だに集積しておらず、多分に経験則に頼っているのが現状である。この大きな原因の一つはメモリーB細胞の分化・活性化シグナル機序が明瞭でないためと考えられる。

本研究は、イメージングをはじめとした新規研究手法を導入して、メモリーB細胞の分化・活性化機序を分子・細胞・個体レベルで明らかにしようとするもので、この基盤的情報の蓄積は、ウイルスをはじめとするワクチン療法の新しい有効な方法の開発につながり、社会的波及効果は甚大である。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Hikida, M., Casola, S., Takahashi, N., Kaji, T., Takemori, T., Rajewsky, K. and Kurosaki, T. PLC γ 2 is essential for formation and maintenance of memory B cells. *J. Exp. Med.* 206, 681-689 (2009).
- Kurosaki, T., Shinohara, H. and Baba, Y. B cell signaling and fate decision. *Ann. Rev. Immunol.* (in press)

【研究期間と研究経費】

平成21年度－25年度

159,400千円

ホームページ等

<http://www.ifrec.osaka-u.ac.jp/jpn/laboratory/lymphocytedifferentiation/index.php>
kurosaki@rcai.riken.jp

【基盤研究(S)】
生物系(医歯薬学I)



研究課題名 T細胞分化を制御する転写因子ネットワークの解明

理化学研究所・免疫転写制御研究チーム・チームリーダー たにうち いちろう
谷内 一郎

研究分野: 免疫学

キーワード: T細胞分化

【研究の背景・目的】

T細胞はエフェクター細胞として免疫反応を担うと共に免疫応答の調節を行う重要な細胞群であり、異なる機能を持つ幾つかの細胞亜群(サブセット)から構成される。T細胞の機能異常や分化バランスの異常によって免疫不全症やアレルギー等のヒト免疫疾患が誘発されることが知られており、これら免疫疾患の病態を理解し、医療に応用可能なT細胞分化制御技術を開発することで、国民の健康増進に貢献することは医学・免疫学の重要な課題である。本研究課題は、複数の転写因子の相互作用によって形成される転写因子ネットワークが如何にT細胞分化を制御するか解明することで、T細胞分化プログラムを総括的に理解することを目的とする。

【研究の方法】

本研究課題では、発生工学による遺伝学的手法、バイオインフォマティクス手法、生化学・分子生物学的手法を有機的に連動させることで、それぞれのT細胞サブセットの分化を制御するマスター転写因子の同定とそれらマスター転写因子上流・下流シグナルを明らかにする。

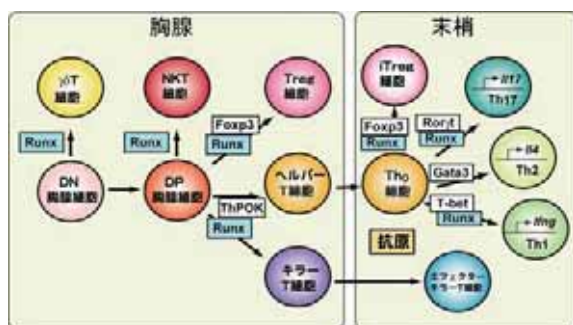


図1. T細胞分化過程と転写因子.

特に、胸腺内でのDP胸腺細胞のヘルパー/キラー系列決定を制御する転写因子ネットワーク、抹消リンパ組織でのヘルパーT細胞サブセットの分化を制御する転写因子ネットワークの解明を

中心に研究を行う。

【期待される成果と意義】

T細胞は免疫応答の調節に中心的な役割を果たすことからT細胞分化プログラムの解明がもたらす意義は大きい。アレルギー・自己免疫病といった免疫疾患の制圧に向けて、人為的にT細胞分化を誘導する新規技術やその応用に基づく新たな免疫制御法の開発に繋がる技術基盤となる成果が期待される。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Setoguchi R. et al. Repression of the transcription factor ThPOK by Runx complexes in cytotoxic T cell development. *Science* 319:816, 2008.
- Muroi S. et al. Cascading suppression of transcriptional silencers by ThPOK seals helper T cell fate. *Nat. Immunol.* 9:1113, 2008.
- Collins A. et al. RUNX proteins in transcription factor networks that regulate T-cell lineage choice. *Nat. Rev. Immunol.* 9:106, 2009.

【研究期間と研究経費】

平成21年度-25年度

159,500千円

ホームページ等

<http://web.rcai.riken.jp/en/labo/regu/taniuchi@rcai.riken.j>



研究課題名 炎症を背景とした消化器発癌過程における ゲノム不安定性の生成機構の解明

京都大学・大学院医学研究科・教授

ちば つとむ
千葉 勉

研究分野：医歯薬学・内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：上部消化管学（食道、胃、十二指腸）、下部消化管学（小腸、大腸）、肝臓学

【研究の背景・目的】

最近、様々な感染そしてそれによる炎症が発癌の母地となることが注目されています。特に消化器病の領域では、ヘリコバクタ・ピロリ感染による慢性胃炎から胃癌が発症すること、またC型、B型肝炎ウイルス感染による慢性肝炎から肝癌が発症すること、さらに潰瘍性大腸炎から大腸癌が発症することなど、炎症が発癌に深く関与することが分かってきました。

一方癌細胞には遺伝子の消失や変異など、様々な遺伝子の異常が存在しており、それが発癌に重要な役割を果たすことが良く知られています。特に最近の大規模な遺伝子変異の解析によって、一つのがん細胞には平均約60-90個の遺伝子変異が存在することが報告されました。このように遺伝子変異は発癌に非常に重要な役割をはたしていますが、しかしながら炎症から癌が生じる過程で、どのようにして遺伝子変異が蓄積していくのかはまだよく分かっていません。

一方、遺伝子異常は通常様々な方法によって抑えられています。しかしながら私たちの体の中には、生理的に常に遺伝子変異が生じている細胞が一つだけあります。それはBリンパ球で免疫グロブリンを産生する細胞です。免疫グロブリン（抗体）は様々な外界の抗原（微生物や花粉などのアレルギー物質など）に反応することによって、これらから身を守る役割を果たす分子です。したがって多数の抗原に対応するためには、数多くの種類の免疫グロブリンが産生される必要がありますが、ところが免疫グロブリンの遺伝子はたった一つしかありません。このためB細胞では、ひとつの免疫グロブリン遺伝子に様々な遺伝子変異を入れることによって、多数の異なった免疫グロブリンを産生できるしくみになっています。この際、この免疫グロブリン遺伝子に遺伝子変異を入れるのに必須の役割を果たしている分子がAIDといわれるもので2000年に発見されました。このAIDは私たちの体の中で、自らの遺伝子(DNA)に変異を入れることのできるたった一つの分子ですが、すでに述べたように通常はBリンパ球でしか発現していません。ところが私たちは2007年に、このAIDが胃炎や肝炎などの炎症の際に、それぞれヘリコバクタ・ピロリ菌やC型肝炎ウイルスなどによって胃粘膜、肝細胞で産生されるようになることを見出しました。そしてさらにそのAIDが免疫グロブリンではなく、胃や肝臓の細胞の様々な遺伝子に変異を入れて、その結果癌の発症を促進させていることを明らかにしました。

このようにAIDは遺伝子変異を入れることができる、ある意味非常に危険な分子ですが、私たちは炎症でこのAIDが産生されるようになることが、炎症から癌が発症する原因の一つではないかと考

えています。そこで今回の研究では、このAIDが炎症の場で、どのように産生されて、どのように遺伝子変異を入れて、そしてさらにその結果どのように癌が発症するのか、を追求していきたいと考えています。

【研究の方法】

- 1) 炎症発癌におけるAIDの普遍的な役割を明らかにします。
- 2) AIDが臓器によってなぜ異なる遺伝子に変異を入れるのかを明らかにします。
- 3) AIDが様々な種類の遺伝子変異を入れる理由を明らかにします。
- 4) 発癌にはメチル化という現象が重要な役割を果たしていますが、このメチル化とAIDによる遺伝子変異の関係を明らかにします。
- 5) 発癌では組織の幹細胞が癌化に重要と考えられていますが、この幹細胞とAIDの関係を明らかにします。

【期待される成果と意義】

近年発癌の研究は、メチル化などのいわゆるエピジェネティックといわれる遺伝子の修飾が重要であると考えられています。しかしながら上述のように、遺伝子変異はやはり発癌で中心的な役割を果たしています。しかし現在まで、炎症でどのようにして遺伝子変異が蓄積されるのかはほとんど分かっていませんでした。さらに遺伝子変異を誘発する分子が私たちの体内に存在することも分かっていませんでした。今回の研究では、炎症から癌が生じる過程で、遺伝子変異が導入される機序が明らかとなり、さらにそれがもともと私たちが持っている分子、AIDによって誘導されることが明確になることで、新しい発癌の機序を提示できるものと期待されます。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Matsumoto Y, Marusawa H, Kinoshita K, Endo Y, Kou T, Morisawa T, Azuma T, Okazaki IM, Honjo T, Chiba T: Helicobacter pylori infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. Nat Med 13:470-476: 2007.
- Endo Y, Marusawa H, Kou T, Nakase H, Fujii S, Fujimori T, Kinoshita K, Honjo T, Chiba T: Activation-induced cytidine deaminase links between inflammation to colitis-associated colorectal cancers. Gastroenterology 135: 889-898:2008.

【研究期間と研究経費】

平成21年度－24年度
120,200千円



研究課題名 Wnt シグナルによる心筋分化・心臓疾患発症機序の解明とそれに基づく治療法の開発

千葉大学・大学院医学研究院・教授 こむろ いっせい
小室 一成

研究分野：医歯薬学

キーワード：循環器・高血圧、再生医学、発生・分化

【研究の背景・目的】

生活習慣の欧米化と高齢化により、我が国においても循環器疾患患者が急増しており、その病態生理の解明と新規治療法の開発が待望されている。Wnt シグナルは多彩な生理学的機能を有し、個体発生、幹細胞機能維持、発癌などに関与することが知られる。きわめて重要なシグナル伝達経路である。これまでの我々の検討により、Wnt シグナルが発生時期依存性に心臓発生・心筋細胞分化を制御していること、また発生後期においてはWnt シグナルを抑制することが心臓の形態形成に重要であることが明らかになった。さらにWnt シグナルが成人期の心不全発症に促進的に働く可能性も示唆されている。そこで本研究では以下の4点について検討することにより、Wnt シグナルによる心臓発生制御の分子機構を解明するとともに、それに基づくWnt シグナルを標的とした新たな心臓疾患治療法の開発を目指す。

- (1) IGFBP-4によるWnt シグナル抑制と心筋分化誘導の分子機構を明らかにする
- (2) Wnt、Wnt inhibitorを用いた未分化幹細胞からの高効率心筋分化誘導法を確立する
- (3) Wnt シグナルの心臓疾患発症における役割を解明する
- (4) Wnt、Wnt inhibitorを利用した新しい心臓疾患の治療法を開発する

【研究の方法】

(1) IGFBP-4によるWnt シグナル抑制と心筋分化誘導の分子機構を明らかにする：我々は最近 insulin-like growth factor (IGF)に結合する蛋白として知られていたIGFBP-4がWnt シグナルを抑制することにより発生後期の心臓形成に大変重要であることを明らかにした。そこでIGFBP-4によるWnt シグナル抑制の分子メカニズムを明らかにするためにBRETを用いてWnt 受容体であるFrzとLRP5/6の会合様式をreal-timeで解析する。

(2) Wnt、Wnt inhibitorを用いた未分化幹細胞からの高効率心筋分化誘導法を確立する：これまでの我々の研究により、Wnt、Wnt inhibitorの適切な組み合わせがES細胞から高効率で心筋細胞を分化誘導することが明らかになった。また、BMP阻害因子による心筋分化誘導についても報告している。これら複数の液性因子の組み合わせによる高効率心筋分化誘導法の確立を目指す。

(3) Wnt シグナルの心臓疾患発症における役割を解明する：虚血性心疾患などによって生じる心筋傷害にWnt シグナルが関与している可能性が考えられており、Wnt シグナル抑制が心疾患の治療標的となる可能性がある。そこで傷害心筋で発現するWnt、Wnt-like ligand および傷害心筋におけるWnt-responsive cellを明らかにする。

(4) Wnt、Wnt inhibitorを利用した新しい心臓疾患の治療法を開発する：ゼブラフィッシュでは心臓を一部切除するとそれが再生することが知られている。そこでWntあるいはWnt阻害因子のtransgenic fishを作成し、心筋再生促進効果について検討する。また、心不全モデルマウスにWnt阻害因子を投与しその治療効果を検討する。

【期待される成果と意義】

Wnt シグナルが心臓の発生段階の各ステップにおいて極めて重要な役割を果たしていることが明らかになり、さらに最近成人期の心不全発症に促進的に働く可能性が示唆されている。Wnt シグナルによる心臓発生・心筋細胞分化の分子機構や心臓疾患発症における役割の解明は、心臓の再生を含めた新しい治療法の開発につながると考えられる。また得られた研究成果は、循環器領域のみならず、Wnt シグナルが関与する他の様々な分野においても応用されることが期待される。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- ・ Naito AT, Komuro I et al. Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103:19812-7.
- ・ Zhu W, Komuro I et al. IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis. Nature. 2008;454:345-9.

【研究期間と研究経費】

平成21年度－25年度
162,900千円



研究課題名 分子標的を介するポリグルタミン病の根本治療法の開発

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授 **そぶえ げん**
祖父江 元

研究分野：医歯薬学

キーワード：神経分子病態学

【研究の背景・目的】

神経変性疾患は特定の細胞が機能障害および死に至る難病であり、その治療は現代医学における喫緊の課題となっている。最近の基礎・臨床研究の進歩により、細胞内への異常な蛋白質蓄積が神経細胞の機能障害や細胞死を惹起することが明らかとされてきているが、分子標的治療の開発と応用は悪性腫瘍に比べると遥かに遅れており、ほとんどの神経変性疾患では有効な根本治療が見出されず今日に至っている。本研究は神経変性疾患の一群であるポリグルタミン病について、病態に根ざした根本的治療法を開発し、臨床応用することにより、本疾患の克服を目指すものである。具体的な治療法の開発手段として、①患者皮膚由来のiPS細胞からニューロンに分化したモデル系を作成し、②ユビキチン-プロテアゾーム系(UPS)を活性化する低分子化合物の探索・同定、③分子シャペロン調節薬の開発と臨床応用、④新たな病態関連分子の探索・同定と、その機能を調節する低分子化合物の開発を4つの柱とし、ポリグルタミン病の分子標的治療の開発を目的とした包括的研究を展開する。

【研究の方法】

1) ポリグルタミン病 iPS 細胞の確立

SBMA・HD・SCA3などの患者から皮膚を採取し、分離した線維芽細胞に遺伝子導入を行うことにより、iPS細胞を誘導する。得られたニューロンはスクリーニングのための細胞システムとして使用する。

2) ユビキチン-プロテアゾーム系(UPS)を標的とした低分子化合物の探索・同定

低分子化合物ライブラリーから、ニューロンに分化したiPS細胞においてUPS活性を増強し、ポリグルタミン鎖の異常延長した変異蛋白質を選択的に分解しうる化合物を同定する。さらに、動物モデルにおける解析を行い、生体におけるUPSの賦活化の有無および神経変性過程を抑制する作用の有無を確認する。また、プロテアソーム活性の促進作用を有する自然成分を発症前のSBMAモデルマウスに投与し、有効性と安全性を解析する。

3) 分子シャペロン調節薬の開発と臨床応用

我々はこれまでに、経口Hsp90阻害剤(17DMAG)およびモノテルペン配糖体(paeoniflorin)が強力な分子シャペロン誘導作用を有することを明らかにしている。これらの低分子化合物について動

物モデルへの投与を行い、その神経障害に対する有効性と安全性および脳移行性を主とした薬物動態について検討する。

4) 新たな病態関連分子の探索・同定と、その機能を調節する低分子化合物の開発

我々はこれまでに、遺伝子発現解析により、神経ペプチドCGRPがSBMAマウス脊髄運動ニューロンにおいて発現が増加していることを明らかにしてきた。本研究では、CGRPが神経細胞に与える影響について培養細胞系および動物モデルを用いて解析する。また、CGRPの発現量を減少させる化合物をスクリーニングし、その効果を培養細胞モデルおよび動物モデルにおいて解析する。

【期待される成果と意義】

本研究により、患者皮膚由来のiPS細胞からニューロンに分化した新しいモデル系が確立され、それを用いた治療薬のスクリーニングが可能となることが期待される。また、UPSや分子シャペロンなどの生体の防御機構を利用した安全性の高い治療法が開発されることが期待される。本研究の成果はポリグルタミン病の根本治療法の開発に向けた臨床試験に繋がる可能性があり筋萎縮性側索硬化症やアルツハイマー病など多くの神経変性疾患にも応用可能な知見を提供すると予想される。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- ・ Banno H, Katsuno M, Suzuki K, et al. Phase 2 trial of leuprorelin in patients with spinal and bulbar muscular atrophy. *Ann Neurol*. 65: 140-150, 2009.
- ・ Tokui K, Adachi H, Waza M, et al. 17-DMAG ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration through well-preserved proteasome function in a SBMA model mouse. *Hum Mol Genet*. 18: 898-910, 2009.

【研究期間と研究経費】

平成21年度－25年度

122,100千円

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/102/p10224.html>



研究課題名 生活習慣病の病態におけるアルドステロン／
鉱質コルチコイド受容体活性化機構の解明

東京大学・医学部附属病院・教授

ふじた としろう
藤田 敏郎

研究分野：医歯薬学

キーワード：腎臓病学、内分泌学

【研究の背景・目的】

アルドステロン／鉱質コルチコイド受容体(MR)は腎臓での塩分の再吸収を司る系で、塩分の少ない環境で生命を維持する手段として重要な役割を果たしてきた。ところが近年、塩分の取り過ぎや過食といった生活習慣の変化に伴い、アルドステロン／MR系の過剰な活性化による高血圧や心血管病、慢性腎臓病(CKD)が問題化するようになった。我々はメタボリックシンドロームモデル動物を用いて、脂肪細胞より分泌される未知の因子(aldoosterone-releasing factors: ARF)がアルドステロン過剰、標的臓器のMR活性化、ひいては臓器障害をもたらすこと、肥満に塩分過剰が加わるとMR活性化が増強し、著しい心腎障害が生じることを示した。さらに新たなMR活性化因子として低分子量G蛋白Rac1を同定し、Rac1がアルドステロン非依存性にMRを活性化し腎障害を引き起こすこと、Rac阻害薬が腎保護薬として有望であることを世界に先駆けて報告した(*Nature Medicine* 14:1370,2008)。

本研究では『Rac1とMRのクロストーク』に焦点をあて、分子細胞生物学的・発生工学的手法など多角的アプローチでメタボリックシンドロームに伴う臓器障害のメカニズムを解明するとともに、ヒトにおけるRac1・MR活性化の意義の検証、新規診断法・治療薬の開発を目指したトランスレショナルリサーチを推進することを目的とする。

【研究の方法】

- (1) メタボリックシンドロームモデル動物(KKAy、SHR肥満、食餌性肥満など)を用いて、臓器障害、Rac1・MR活性化状態、Rac阻害薬やMR阻害薬の臓器保護効果、糖代謝・脂肪細胞への影響を検討する。またRac1活性化を惹起する因子を探索する。
- (2) 臓器・細胞特異的Rac1トランスジェニック・ノックアウトマウス(腎系球体足細胞など)を作製し、当該細胞におけるRac1活性化とMRカスケード・臓器障害の関係を検証する。
- (3) SHR肥満ラットと非肥満SHRの脂肪細胞培養液の比較に基づき、脂肪細胞由来アルドステロン分泌刺激因子ARFを同定する。
- (4) 新たなMR活性化機構の同定。
- (5) 新規治療薬(Rac、ARF、新たに同定された治

療標的分子に対する阻害薬)の開発を進める。診断法に関しては、血中アルドステロン濃度に代わる臓器MR活性化指標を同定するとともに、活性型Rac1の可視化法を開発し、腎生検サンプルなど臨床検体を用いてRac1・MR系が関与する病態を特定する。さらに大規模臨床試験にてメタボリックシンドロームの臓器障害に関する日本人のエビデンスの蓄積をはかり、同時にtailor-made medicineを目的とした遺伝子多型解析を行う。

【期待される成果と意義】

最近、メタボリックシンドロームの病態においてアルドステロン／MR系の関与を裏付ける臨床知見が蓄積されつつあるが、血中アルドステロン濃度が必ずしも高くない症例も多く、Rac1その他によるリガンド非依存的MR活性化機構の解明は臨床的に極めて重要な意味を持つと考えられる。

本研究を通じてメタボリックシンドロームの臓器障害に関する病態の理解が深まり、新たな治療標的分子の同定、画期的診断法・治療法の開発、日本人の臨床的エビデンスの確立がもたらされれば、患者の生命予後を改善させ、さらには人工透析の回避が可能となる。現在、透析予備軍であるCKD患者数は約400万人と推定されており、医療経済的にも社会貢献につながることが期待される。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- ・ Shibata S, Fujita T et al. Modification of mineralocorticoid receptor function by Rac1 GTPase: implication in proteinuric kidney disease. *Nature Medicine* 14:1370-1376, 2008.
- ・ Nagase M, Fujita T et al. Enhanced aldosterone signaling in the early nephropathy of rats with metabolic syndrome: possible contribution of fat-derived factors. *J Am Soc Nephrol* 17:3438-3446, 2006.

【研究期間と研究経費】

平成21年度－25年度

162,900千円

ホームページ等

fujita-dis@h.u-tokyo.ac.jp



研究課題名 間葉系細胞由来ホルモンの生理作用とその破綻

なかお かずわ

京都大学大学院・医学研究科・教授 中尾 一和

研究分野：医歯薬学

キーワード：内分泌学

【研究の背景・目的・研究の方法】ホルモンは内分泌細胞から分泌され、血液中を運搬され、生体内の標的細胞に到達し、特異的な受容体を介して作用を發揮する。この生体内化学的情報伝達系が内分泌系であり、その機能は生殖、成長や発達、内部環境の維持、エネルギーの産生、利用、貯蔵などである。従来、ホルモンは下垂体、甲状腺、副腎などの上皮系細胞から分泌されると考えられてきた。一方、心血管系、脂肪組織、骨格系など間葉系細胞から成る組織は、それぞれ血液循環のポンプ機能、エネルギー貯蔵機能、運動機能を担うと考えられてきたが、近年、ホルモンを分泌する内分泌臓器でもあることが明らかになってきた。研究代表者らは心臓血管ホルモンの原型の ANP、BNP、CNP より成るナトリウム利尿ペプチドファミリー(図1)、代表的脂肪細胞由来ホルモン(アディポサイトカイン)(図2)であるレプチンの臨床的意義について遺伝子操作マウスの開発と解析、臨床応用を目的としたトランスレーショナルリサーチを実践して、ANP、BNP を心不全の診断マーカー及び治療薬として実用化し、全身の脂肪組織の欠如した全身性脂肪萎縮症の特効薬としてのレプチンの意義を証明し、骨軟骨系無形成症に

図1 内分泌臓器としての心血管系と心臓血管ホルモン



図2 生体内最大の内分泌臓器としての脂肪組織とアディポサイトカイン



図3 軟骨無形成症における CNP の意義



対する CNP の前臨床研究を行ってきた(図3)。

CNP 及びその受容体である GC-B は脳神経系、血管構成細胞(血管内皮細胞、平滑筋細胞)、骨軟骨細胞など広範に発現しており、各臓器特異的な機能解明が重要である。研究代表者らは既に CNP の全身性遺伝子欠損(KO)マウスを開発して、解析してきたが、骨格系の発達異常が極めて高度であるために骨格系以外の意義に関する解析が不可能であった。本研究では組織特異的な CNP/GC-B 系の生理作用と破綻病態の解明を目的として、Cre-loxP システムにより CNP/GC-B 系の組織特異的 KO マウスを開発して解析する。

脂肪細胞から分泌される抗肥満ホルモンのレプチンに関して、肥満におけるレプチンの抗肥満作用の減弱が認められ、レプチン抵抗性として重要な研究課題になっている。肥満はインスリン抵抗性、糖脂質代謝異常、脂肪肝などを引き起こし、それらは脂肪毒性(Adipotoxicity)と総称される。本研究ではレプチン抵抗性と、レプチンによる脂肪毒性改善作用の分子機構を解明する。

さらに本研究では間葉系細胞由来組織から新規生理活性物質の単離同定も目指す。

【期待される成果と意義】本研究は心血管系、脂肪組織、骨軟骨系など間葉系細胞から分泌される間葉系細胞由来ホルモンの生理作用と破綻病態を上皮系細胞と対比して系統的に比較検討し、生理的意義と臨床的意義の解明を目標とする。本研究は、難病の軟骨無形成症に対する CNP 治療や全身性脂肪萎縮症に対するレプチン補充療法などの新規治療法の開発につながることを期待される。本研究は骨軟骨系に加えて他の臓器における CNP/GC-B 系の意義の解明、臨床応用の可能性を開くものである。また、レプチン抵抗性とレプチンの脂肪毒性改善作用の解明に大きく貢献し、稀少難病のみならず Common Disease の糖尿病、メタボリック症候群、肥満症などの治療法開発に大きな進展をもたらすと考えられ、臨床的意義は大きい。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- ・ Nakao K. Adiposience and adipotoxicity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*.5(2):63 2009
- ・ Yasoda A, Nakao K. et al. Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat Med*. 10(1):80-6. 2004

【研究期間と研究経費】

平成21年度-25年度
163,000千円
ホームページ等

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~med2/index-jp.html>

【基盤研究(S)】

生物系(医歯薬学Ⅱ)



研究課題名 天疱瘡抗原に対する中枢性、末梢性免疫寛容機構の解明

慶應義塾大学・医学部・教授

あまが い まさゆき
天谷 雅行

研究分野：医歯薬学

キーワード：皮膚診断学、皮膚免疫学

【研究の背景・目的】

本研究では、自己免疫性皮膚疾患である天疱瘡の標的抗原、デスモグレイン3 (Dsg3) に対する中枢性および末梢性免疫寛容機構獲得機序を解析するとともに、免疫寛容に関わる皮膚樹状細胞の役割を明らかにし、胸腺に代わる免疫制御臓器としての皮膚の新たな機能を解明する。我々の構築する系は、自己免疫疾患標的抗原である Dsg3 の生理的発現状況下における免疫寛容機構を、抗原存在下、非存在下における自己反応性 T 細胞の運命を解析することができ、免疫寛容機序を解析する上において、世界に類を見ない疾患に根ざした独創的な系となる。

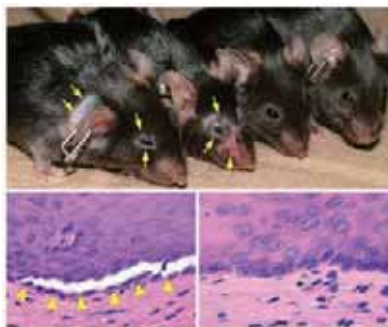
【研究の方法】

1) Dsg3 反応性 T 細胞に対する免疫寛容機構の解明

Dsg3 に対する免疫寛容機構を包括的に解析するために、Dsg3 反応性 T 細胞クローンの中で、同一のペプチド (Dsg3₃₀₁₋₃₁₅) を認識するが高親和性と低親和性を示す T 細胞受容体 (TCR) および他のペプチドを認識する TCR の合計 3 種の Dsg3TCR-Tg マウスを作成する。Dsg3TCR-Tg マウスにおける、胸腺、末梢における Dsg3 反応性 T 細胞の動態を、Dsg3 存在下、非存在下 (Dsg3^{-/-}マウスと交配) において比較検討する。

2) 細胞障害性 T 細胞誘導と腫瘍随伴性天疱瘡

Dsg3^{+/+}皮膚を Dsg3^{-/-}マウスに移植した後にそのリンパ球を、Rag2^{-/-}マウスに移植すると、抗体産生のみならず、表皮に CD4⁺あるいは CD8⁺T 細胞が浸潤し、表皮細胞の apoptosis を誘導される。天疱瘡の亜型である腫瘍随伴性天疱瘡では、抗 Dsg3IgG 抗体のみならず、皮膚への T 細胞浸潤、apoptosis を認める。本モデル



Dsg3 特異的 T 細胞単一クローンにより誘導された天疱瘡モデルマウス

マウスの解析により、未だ不

明な点が多い細胞障害性 T 細胞による皮膚疾患の病態解明を試みる。

3) 病的抗体産生および免疫寛容における樹状細胞の役割の解明

Cre-LoxP システムを利用して表皮のランゲルハンス細胞と真皮の樹状細胞をそれぞれ特異的に消去したマウスを確立した上で、天疱瘡モデルマウスのレシピエントとし、どの皮膚樹状細胞サブセットが発症に重要な役割を果たすか解明する。

4) 胸腺に代わる免疫制御臓器としての新たな皮膚機能の検討

本研究で開発したマウスを組み合わせ、皮膚は Dsg3 を発現し、胸腺は Dsg3 を発現しない状況を作成し、Dsg3 反応性 T 細胞に免疫寛容が成立するかを検討する。「皮膚が胸腺に代わる免疫制御機能を有する」という仮説のもと、新しい免疫学的概念を提唱することを目指す。

【期待される成果と意義】

現在の免疫寛容のドグマ形成に至った実験事実が、人工抗原をケラチンプロモーターなどにより各臓器に発現させる非生理的な系に基づいているのに対し、本研究では、自己免疫疾患標的抗原である Dsg3 の生理的発現状況下における免疫寛容機構を解析している。疾患としての天疱瘡と、その病態を可能な限り反映しているモデルマウス、そして、解析するための種々の reagents を有効に組み合わせて総合的に解析できる本研究は、自己免疫疾患克服につながる免疫制御法の開発に役に立つ。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

Takahashi H, et al: Novel system evaluating in vivo pathogenicity of desmoglein 3-reactive T cell clones using murine pemphigus vulgaris. J Immunol 181: 1526-1535, 2008.

Takahashi H, et al: A single helper T-cell clone is sufficient to commit polyclonal naïve B-cells to produce pathogenic IgG in experimental pemphigus vulgaris. J Immunol 182: 1740-1745, 2009.

【研究期間と研究経費】

平成 21 年度 - 25 年度

161,800 千円

ホームページ

<http://web.sc.itc.keio.ac.jp/derma/index.html>

【基盤研究(S)】

生物系(医歯薬学Ⅱ)



研究課題名 高精度の分子遺伝学的評価による食道癌治療成績向上のための包括的研究

大阪大学・大学院医学系研究科・教授 もり まさき
森 正樹

研究分野：医歯薬学

キーワード：外科学、分子遺伝学、オミックス医療

【研究の背景・目的】

食道進行癌は治療抵抗性で予後不良である。特に食道リンパ流の解剖学的特徴から、周辺多臓器への複合型の転移浸潤を来しやすく、特有の治療困難が付随する。したがって、治療成績向上のためには、食道癌の発生、進展および治療感受性に関わる個人の三位一体 P-E-G 因子を根本から究明し、総合的かつ俯瞰的に解明する。特に、治療感受性については、化学放射線療法の術前治療効果予測に応用するために緊喫に求められている。

【研究の方法】

三位一体の研究を超高密度で緻密に実施する。そのために、①解析症例数を大幅に増やす。②観察期間を最低でも5年以上とする。③現時点で最高レベルの機器・技術で解析する。④プロテオミクス解析を加える。⑤化学放射線療法の感受性に関する検討を加える。以上の各要因を同一症例で合わせて解析する三位一体の研究とする。これにより、遺伝子多型 P、環境因子 E、遺伝子・蛋白変化 T の最高レベルのデータを得、発癌・進展・転移・再発・治療感受性・薬剤副作用の各々に強く関与する P-E-T 連関を究明する。

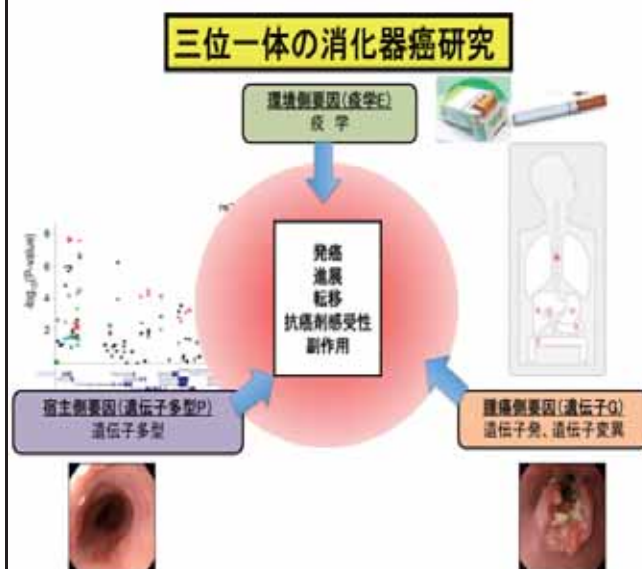
<目的達成のための重点6項目>

- (1) 世界最高レベルの超高密度 50 万遺伝子多型 (SNPs) 解析を実施 (宿主側要因)
- (2) 世界最高レベルの (CGH) アレイによる腫瘍ゲノム情報整備 (腫瘍側)
- (3) 業界最高感度 OMICS 解析による遺伝子最終産物の把握 (宿主側・腫瘍側)
- (4) 非コード転写産物 (マイクロRNA等) の最新の機能解析 (宿主側・腫瘍側)
- (5) 本邦の代表的食道癌診療施設で収集した多数例の精密な疫学・臨床情報解析 (環境)
- (6) 世界最高精度の治療感受性・副作用予測法の開発 (宿主側・腫瘍側)

【期待される成果と意義】

同一症例から環境・宿主多型・腫瘍遺伝子の3側面を多数例で解析する研究は、学際的に鑑みて

も世界で例がなくユニークであり、日本人食道癌の全体像を俯瞰的に明らかにできる。今後はこのような多数例を用いた多面的・統合的研究が必須となると想定され、本研究はその先鞭となり学際的にも大きなインパクトを与えると期待される。



【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Cancer Res 69(9):3788-3794, 2009.
- Clin Cancer Res 14(9):2609-2616, 2008.
- Cancer Res 68(4):1074-1082, 2008.
- Cancer Sci 99(10): 1871-1877, 2008.
- Ann Surg Oncol 15(10): 2927-2933, 2008.
- Oncologist 12(4):406-417, 2007.
- Stem Cells 24(3):506-513, 2006.
- N Engl J Med 352:1667-1676, 2005.

【研究期間と研究経費】

平成21年度-25年度
162,700千円